



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**Daño en ADN espermático y factores de riesgo
ocupacional en pacientes con problemas de fertilidad
en Lima, Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en
Zoología

AUTOR

Antuane Wendy ZEVALLOS MURGADO

ASESOR

José Luis Rafael PINO GAVIÑO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Zevallos, A. (2019). *Daño en ADN espermático y factores de riesgo ocupacional en pacientes con problemas de fertilidad en Lima, Perú*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECAÑA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN ZOOLOGÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 18:03 horas del 22 de mayo de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en **Zoología de ANTUANE WENDY ZEVALLOS MURGADO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 023-EPCB-2018, la titulando expuso su tesis: **"DAÑO EN ADN ESPERMÁTICO Y FACTORES DE RIESGO OCUPACIONAL EN PACIENTES CON PROBLEMAS DE FERTILIDAD EN LIMA, PERÚ"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con máximos honores.

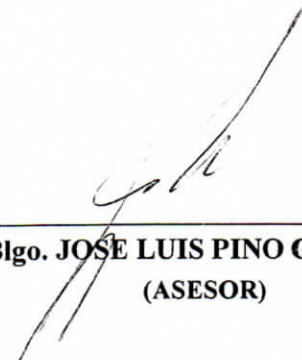
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga con mención en **Zoología** a **ANTUANE WENDY ZEVALLOS MURGADO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 18:15 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 22 de mayo de 2019.




Dr. DAN VIVAS RUIZ
(PRESIDENTE)



Blgo. JOSÉ LUIS PINO GAVIÑO
(ASESOR)



Blga. BETTY SHIGA OSHIGE
(MIEMBRO)



Blga. HAYDEE TEMOCHE GARCIA
(MIEMBRO)

A mis padres: Carmen y Raúl
Por la vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por cuidar de mí y mis seres queridos, y por permitirme seguir creciendo.

Agradezco a mi familia, mis hermanos, mis sobrinos y en especial a mis padres Carmen y Raúl por su amor, protección y apoyo incondicional en esta y todas las hazañas que me he propuesto realizar.

Agradezco a mi profesor y asesor Blgo. José Luis Rafael Pino Gaviño, por su apoyo en la realización de esta tesis, por sus consejos a lo largo de este tiempo y por ayudarme en la formación como profesional.

Asimismo, manifiesto mi agradecimiento al Tecnólogo Médico Jaime Rosales por su confianza, apoyo en la revisión del proyecto y por darme la oportunidad de desarrollar la tesis en el Laboratorio Clínico del Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Medio Ambiente para la Salud (CENSOPAS). A la bióloga Ismenia Gamboa, al Dr. Garnique del Instituto Nacional Materno Perinatal (INMP) por permitir que realice la tesis con las muestras del Centro Nacional. Al biólogo Ricardo Pella por permitir que realice parte de la tesis con muestras del Centro de Fertilidad y Reproducción Asistida (CEFRA).

Al Instituto Nacional de Salud (INS) por el apoyo logístico, y a todos los pacientes que confiaron en el proyecto y participaron.

Agradezco a Antonio Flores, Jorge Inolopú, Lenin Rueda, Lizeth Padilla y Estefanía Morales que hicieron el trabajo en el INS mucho más fácil. A Ángelo Torres, Marilyn Reyna, Julissa Fuentes, Leonor Contreras, Dina Torres, Jackelin Zevallos, Ruth Barrientos y Don Sergio Talavera por su amistad y gratos momentos en las respectivas áreas del INMP.

Sin duda, muchísimas personas fueron importantes para la realización de esta tesis, y pues como olvidar a los mejores, mis mejores amigos por el aliento y el apoyo incondicional, entre ellos: Abigail Gutiérrez, Diego Deville, Fernando Tapia y Wolfram Seifert por acompañarme en esta larga travesía.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- INMP: Instituto Nacional Materno Perinatal
- INS: Instituto Nacional de Salud
- OMS: Organización Mundial de la Salud (siglas en español de WHO, bibliografía)
- ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology (siglas en inglés)
- LIR: Límite Inferior de Referencia
- IMC: Índice de Masa Corporal
- EROs: Especies Reactivas de Oxígeno
- TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling (siglas en inglés)
- SCD: Sperm Chromatin Dispersion (siglas en inglés)
- SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay (siglas en inglés)
- DBD Breakage Deteccion (siglas en inglés)
- FISH: Fluorescence In Situ Hybridization (siglas en inglés)
- SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis (siglas en inglés)
- RDC: Ruptura Doble Cadena
- HR: Homologous Recombination (siglas en inglés)
- NHEJ: Non-Homologous End Joining (siglas en inglés)
- DTT: Ditioneitol
- CENSOPAS: Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Medio Ambiente para la salud
- CEFRA: Centro de Fertilidad y Reproducción Asistida
- NaCl: Cloruro de Sodio
- EDTA: Ácido Etildiaminotetraacético
- Tris: Tris-Buffered Saline
- HCl: Ácido Clorhídrico
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
- PBS: Phosphate Buffered Saline (siglas en inglés)

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. ESPERMATOZOIDE HUMANO	5
2.1.1. Estructura del espermatozoide, tamaño y forma.....	5
2.1.2. Espermatogénesis	6
2.2. ADN ESPERMÁTICO	7
2.3. PARÁMETROS SEMINALES	8
2.4. INFERTILIDAD MASCULINA.....	9
2.5. DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO	11
2.6. MECANISMOS QUE INDUCEN AL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO	12
2.7. LA FRAGMENTACIÓN DE ADN Y LA OCUPACIÓN.....	13
2.7.1. Detección del daño del ADN espermático	14
2.7.2. Mecanismos de reparación	15
2.8. ENSAYO COMETA.....	16
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	18
3.1. OBJETIVO GENERAL	18
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	18
3.3. HIPÓTESIS	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. ÁMBITO DE ESTUDIO	19
4.2. TIPO DE ESTUDIO	19
4.3. TIPO DE MUESTREO	19
4.4. MATERIALES DE LABORATORIO	19
4.5. POBLACIÓN Y MUESTRA	21
4.6. GESTIÓN DE PACIENTES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS	21
4.7. ESTRUCTURA DEL CUESTIONARIO (DETERMINACIÓN DE FACTORES DE RIESGO OCUPACIONAL)	22
4.8. MATERIAL BIOLÓGICO	22
4.9. LUGAR DE MUESTREO	22
4.10. METODOLOGÍA.....	23
4.11. ESPERMATOGRAMA	24
4.12. METODOLOGÍA DEL ENSAYO COMETA.....	28
V. RESULTADOS.....	34
VI. DISCUSIÓN.....	62
VII. CONCLUSIONES.....	68
VIII. RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. A) PRINCIPALES ELEMENTOS DE UN ESPERMATOZOIDE HUMANO QUE SON COMUNES EN TODAS LAS ESPECIES DE MAMÍFEROS (HIDALGO <i>ET AL.</i> 2005). B) CABEZA O PIEZA PRINCIPAL DEL ESPERMATOZOIDE. C) CUELLO O PIEZA MEDIA DE UN ESPERMATOZOIDE VISTO TRANSVERSALMENTE (MODIFICADO Y TRADUCIDO DE AMANN & PICKETT , 1987 Y WANG 2007)...	6
FIGURA 2. ESPERMATOGÉNESIS. FUENTE: (BARRETT <i>ET AL.</i> 2013). FISIOLÓGÍA MÉDICA.....	7
FIGURA 3. FACTORES ASOCIADOS A INFERTILIDAD MASCULINA. GUÍA CLÍNICA SOBRE LA INFERTILIDAD MASCULINA. FUENTE: DOHLE <i>ET AL.</i> 2010.....	10
FIGURA 4. RESUMEN DE LAS PRINCIPALES CAUSAS DE DAÑO EN EL ADN. FUENTE: ÁLVAREZ & GOSÁLVEZ (2011), WARD (2011).....	11
FIGURA 5. MECANISMOS PRINCIPALES DE INDUCCIÓN DE DAÑO AL ADN EN ESPERMATOZOIDES DURANTE LA PRODUCCIÓN O EL TRANSPORTE DE LAS CÉLULAS. FUENTE: SAKKAS & ÁLVAREZ 2010.	13
FIGURA 6. ENSAYO COMETA NEUTRO Y ALCALINO. FUENTE: SHAMAN & WARD 2006.....	17
FIGURA 7. METODOLOGÍA DEL ENSAYO COMETA. FUENTE: HAINES <i>ET AL.</i> (1998) Y HUGHES <i>ET AL.</i> (1997).....	17
FIGURA 8. ESTRUCTURA DE LA CÁMARA DE NEUBAUER Y LUGAR DE COLOCACIÓN DE LA MUESTRA. FUENTE: OMS (2010).	27
FIGURA 9. FORMA CORRECTA DE COLOCAR LAS LÁMINAS EN EL TANQUE DE ELECTROFORESIS. FUENTE: <i>THE EUROPEAN NETWORK ON THE HEALTH AND ENVIRONMENTAL IMPACT OF NANO MATERIALS. COMET ASSAY</i>	30
FIGURA 10. DIAGRAMA TÍPICO DE LOS COMPONENTES DE UN COMETA. (STEELE <i>ET AL.</i> 1999).....	31
FIGURA 11. IMÁGENES DEL <i>COMET ASSAY IV</i> . A) TL 14.36/ TI 0.18/ TM 0.02 B) TL 27.69/ TI 7.30/ TM 1.03 C) TL 43.59/ TI 24.70/ TM 4.46 D) TL 51.28/ TI 58.59/ TM 10.28 E) TL 49.74/ TI 64.39/ TM 10.89 (TL=TAIL LENGTH, TI=TAIL INTENSITY Y TM=TAIL MOMENT).....	32
FIGURA 12. RESUMEN DE LA DISTRIBUCIÓN NORMAL PARA LA VARIABLE PORCENTAJE DE FORMAS NORMALES (P=0.95837, P=0.76724).....	34
FIGURA 13. EL PORCENTAJE DE INTENSIDAD DE ADN EN LA COLA (P = 0.003) Y LA LONGITUD DE LA COLA (P = 0.014) VS. ABORTOS PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	36
FIGURA 14. EL PORCENTAJE DE INTENSIDAD DE LOS QUE FUMAN OCASIONALMENTE Y LOS QUE NO PRESENTAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (P = 0.024) A DIFERENCIA DEL MOMENTO Y LONGITUD DE LA COLA, QUE NO MUESTRAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (P = 0.151).	38
FIGURA 15. LA INTENSIDAD DE COLA ES SIGNIFICATIVAMENTE MAYOR EN EL GRUPO QUE TRABAJA MÁS DE 11 AÑOS.	38
FIGURA 16.1. VALORES DEL PARÁMETRO VS. LOS GRUPOS: C=CONTROL, EXPOSICIÓN A CALOR, CE= CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS, HIDROCARBUROS, METALES PESADOS, PESTICIDAS, PINTURAS, RADIACIONES, SEDENTARISMO Y VIBRACIONES. EN EL CASO DE LOS PARTICIPANTES CONTROL (N=8) SON JÓVENES QUE SE ENCUENTRAN DENTRO DEL GRUPO G1 DE EDAD, TIENEN HIJOS Y LOS PARÁMETROS SEMINALES MOSTRARON NORMOZOOSPERMIA: PERTENECEN AL GRUPO DE PARTICIPANTES ADICIONALES.	41
FIGURA 17. NO EXPUESTOS VS EXPUESTOS (P < 0,05).....	45
FIGURA 18. LA IMAGEN A CORRESPONDE AL TRATAMIENTO SOLO DE PROTEÍNAS K, SIN DTT. ADEMÁS, LAS PRIMERAS PRUEBAS LA DILUCIÓN FUE INEXACTA. B Y C MUESTRAN EL MISMO TRATAMIENTO, PERO EN DIFERENTE PACIENTE. TIEMPO DE INCUBACIÓN EN PROTEINASA K + DTT ES DE 40 MINUTOS A 37° C.....	46
FIGURA 19. EN LA FIGURA A SE OBSERVA LOS PUNTOS COMO PRUEBAS INDEPENDIENTES EN LOS TRATAMIENTOS REALIZADOS A DIFERENCIA DE LA FIGURA B QUE MUESTRA EL PROMEDIO DE LOS TRATAMIENTOS SEGÚN EL PACIENTE.	47

FIGURA 20. DENSIDAD DEL PORCENTAJE DE INTENSIDAD DEL PARTICIPANTE 1 (CONTROL B) Y 2 (CONTROL A) EN CONDICIONES NORMALES Y MUESTRA TRATADA CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. SE APRECIA QUE LAS MUESTRAS SIN TRATAMIENTO TIENEN UNA CAMPANA A LA IZQUIERDA.	47
FIGURA 21. CORRELACIÓN POTENCIAL EXPONENCIAL POSITIVA DE LOS 26 PACIENTES AL AZAR.	49
FIGURA 22. DENSIDAD DEL PORCENTAJE DE INTENSIDAD DE ADN EN LA COLA DE LOS 26 PACIENTES AL AZAR.....	49
FIGURA 23. DISTRIBUCIÓN DE LAS OCUPACIONES EN EL GRUPO DE ALTO RIESGO. LEPECKA-KLUSEK <i>ET AL.</i> 2011.....	50
FIGURA 24. DISTRIBUCIÓN DE LAS OCUPACIONES EN EL GRUPO DE MEDIANO RIESGO. LEPECKA-KLUSEK <i>ET AL.</i> 2011	51
FIGURA 25. DISTRIBUCIÓN DE LAS OCUPACIONES EN EL GRUPO DE BAJO RIESGO. LEPECKA-KLUSEK <i>ET AL.</i> 2011.....	51
FIGURA 26. EL PORCENTAJE DE INTENSIDAD DE ADN EN LA COLA VS. PARÁMETROS SEMINALES (P=0.0015), MUESTRAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (MANN-WHITNEY).	55
FIGURA 27. NORMOZOOSPERMIA VS. TERATOZOOSPERMIA, DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS DEL ENSAYO COMETA (P= 0.0008).	56
FIGURA 28. PACIENTES CON NORMOZOOSPERMIA Y CON UNO, DOS, TRES O CUATRO PARÁMETROS ALTERADOS VS. EL PORCENTAJE DE INTENSIDAD DE ADN EN LA COLA.	56
FIGURA 29. CORRELACIÓN DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LOS PARÁMETROS DEL ENSAYO COMETA, EN LOS TRES CASOS, LA CORRELACIÓN ES NEGATIVA.....	57
FIGURA 30. CORRELACIÓN DE LA MOVILIDAD (R=-0.1083), LA VITALIDAD (R=-0.1948) ESPERMÁTICA Y LOS PARÁMETROS DEL ENSAYO COMETA, LA CORRELACIÓN ES NEGATIVA.....	58
FIGURA 31. CORRELACIÓN MUY FUERTE (VALOR CERCANO A 1) Y ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE AMBOS PARÁMETROS MOMENTO DE LA COLA Y EL PORCENTAJE DE INTENSIDAD (R=0.9719).....	58
FIGURA 32. A MAYOR EXPOSICIÓN A FACTORES DE RIESGO EN EL TRABAJO, MAYOR SERÁ EL PORCENTAJE DE INTENSIDAD (P=0.0014), MOMENTO DE LA COLA (P=0.0013) Y LONGITUD DE LA COLA (P=0.0304).	59
FIGURA 33. PARÁMETROS DE DAÑO A NIVEL DE ADN SEGÚN LA OCUPACIÓN, GRUPOS DE PACIENTES Y CONTROL SEGÚN TRATAMIENTO.	60

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DENOMINACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE PATOLOGÍAS SEMINALES SEGÚN EL MANUAL DE LA OMS 2010.	9
TABLA 2. ESTILO DE VIDA Y DAÑO DEL ADN. FUENTE: WRIGHT <i>ET AL.</i> 2014	14
TABLA 3. TAMAÑO DE MUESTRA Y PRECISIÓN DEL ESTUDIO.	21
TABLA 4. SUB-GRUPOS DE PACIENTES POR EDAD.....	24
TABLA 5. AGRUPACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES SEGÚN SU MOVILIDAD.....	26
TABLA 6. GRUPOS ETARIOS Y PARÁMETROS SEMINALES VS. INFORMACIÓN DE LOS PACIENTES. (N=NORMOZOOSPERMIA; P.S.A=PARÁMETROS SEMINALES ALTERADOS).	35
TABLA 7. NÚMERO DE PACIENTES QUE RESPONDIERON SI/NO.	37
TABLA 8. EXPOSICIÓN A FACTORES DE RIESGO OCUPACIONAL ANALIZADOS VS. EL PORCENTAJE DE PROGRESIVOS, PORCENTAJE DE VITALIDAD, CONCENTRACIÓN Y EL PORCENTAJE DE INTENSIDAD.	39
TABLA 9. PACIENTES Y CONTROLES (VARONES CON HIJOS, NORMOZOOSPERMIA Y JÓVENES) VS. LOS PORCENTAJES DE PROGRESIVOS Y VITALIDAD; CONCENTRACIÓN Y EL PORCENTAJE DE INTENSIDAD.....	43
TABLA 10. PARÁMETROS SECUNDARIOS DEL ENSAYO COMETA: MOMENTO DE LA COLA Y LONGITUD DE LA COLA; Y MORFOLOGÍA COMPARANDO EL GRUPO CONTROL CON EL GRUPO DE PACIENTES, SE OBSERVA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA PARA LOS GRUPOS.	43
TABLA 11. CARACTERÍSTICAS LOS PACIENTES EXPUESTOS Y NO EXPUESTOS A RIESGOS QUÍMICOS O FÍSICOS.....	44
TABLA 12. PACIENTES QUE USAN EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL Y LOS PARÁMETROS DEL DAÑO EN EL ADN DEL ESPERMATOZOIDE.	44
TABLA 13. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS PARA LOS GRUPOS SIN TRATAMIENTO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	48
TABLA 14. RIESGO OCUPACIONAL VS. EDAD, % PROGRESIVOS, % VITALIDAD, CONCENTRACIÓN Y % NORMALES.....	52
TABLA 15. PORCENTAJE DE INTENSIDAD VS. RIESGO OCUPACIONAL.	52
TABLA 16. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS SEMINALES DEL ESPERMATOGRAMA; SEGÚN LA EDAD Y LA CONCLUSIÓN.....	54
TABLA 17. LOS RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DEL ENSAYO COMETA; SEGÚN LA EDAD Y LA CONCLUSIÓN.....	54
TABLA 18. SE MUESTRA EL TIPO DE CORRELACIÓN (VALOR R) ENTRE LOS PARÁMETROS SEMINALES Y DEL ENSAYO COMETA.	57
TABLA 19. PACIENTES CON NORMOZOOSPERMIA Y PARÁMETROS SEMINALES ALTERADOS SEGÚN OCUPACIÓN.....	61
TABLA 20. RESUMEN DE BUFFERS Y SOLUCIONES USADAS PARA EL ENSAYO COMETA ALCALINO.....	86
TABLA 21. EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINASA K EN EL BUFFER DE LISIS, MUESTRA TRATADA CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO VERIFICACIÓN DE RESULTADOS SEGÚN ALTAKRONI 2014* Y COMPARACIÓN CON EL PRESENTE ESTUDIO (SIN RESULTADOS).....	87
TABLA 22. DAÑO GENOTÓXICO (ENSAYO COMETA) EN PACIENTES EXPUESTOS Y NO EXPUESTO.	87

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. GESTIÓN DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO.....	23
ESQUEMA 2. METODOLOGÍA DEL ENSAYO COMETA EN EL INMP Y EL INS.	29

RESUMEN

El factor masculino contribuye hasta en un 50% en los problemas de infertilidad en parejas. A nivel mundial, existen informes de una reducción en la fertilidad masculina causada por el estilo de vida y las exposiciones tanto ocupacionales como ambientales que afectan a los parámetros seminales y a la estabilidad del ADN espermático. La exposición a los riesgos ocupacionales asociados a la reproducción en el varón a menudo se pasa por alto o por desconocida, afectando así, su función a través de uno o más mecanismos resultando en casos de infertilidad o embarazo sin éxito. El objetivo de esta investigación fue asociar los factores de riesgo ocupacional con el daño en el ADN espermático medido con el ensayo Cometa en base a un modelo descriptivo. Un total de 137 pacientes participaron en el estudio, entre marzo del 2016 y marzo del 2017, a los cuales se les realizó una encuesta. Se realizó el espermograma y la electroforesis en gel de agarosa de células individuales o ensayo Cometa, encontrando que los pacientes con ocupaciones de alto riesgo (agricultores; cocineros; taxistas; soldadores; electricistas; electrónicos y operarios químicos) tienen mayor daño a nivel de ADN espermático que los pacientes de bajo riesgo (personal de oficina; comerciantes; inspectores; estibadores y docentes), el porcentaje de intensidad fue 44.72 ± 16.07 y 15.55 ± 16.51 respectivamente ($p=0.0001$). En el caso de los pacientes con ocupaciones de bajo riesgo el porcentaje de intensidad fue 12.04 ± 15.33 para normozoospermicos y 20.48 ± 17.12 para varones con algún parámetro seminal alterado, encontrándose diferencia significativa ($p=0.0175$). Además, los pacientes expuestos a más factores de riesgo ocupacional presentan un daño mayor a nivel de ADN espermático a diferencia de los no expuestos (momento de la cola: $p=0.0167$; porcentaje de intensidad: $p=0.0334$; longitud de la cola: $p=0.0167$). Se evidenció que, la edad y a más años trabajando en actividades de alto riesgo ($p < 0.05$), mayor era el daño a nivel de ADN espermático. En la presente investigación no se observaron diferencias significativas a nivel de parámetros seminales y ocupación ($p \geq 0.05$). Se concluye que, la suma de los factores de riesgo ocupacional está asociada al daño en el ADN espermático y las ocupaciones de alto riesgo presentan mayor daño, por ello es importante que los varones en edad fértil tengan acceso a la información sobre los riesgos laborales potenciales y a la prevención para evitar la exposición y preservar su salud reproductiva.

Palabras clave: Infertilidad, fragmentación del ADN espermático, ensayo Cometa, ocupaciones, porcentaje de intensidad.

ABSTRACT

The male factor contributes up to 50% in the problems of infertility in couples. Worldwide, there are reports of a reduction in male fertility caused by lifestyle and both occupational and environmental exposures that affect seminal parameters and stability of sperm DNA. Exposure to occupational risks associated with male reproduction is often overlooked or unknown, thus affecting its function through one or more mechanisms resulting in cases of infertility or pregnancy without success. The objective of this investigation was to associate the occupational risk factors with the sperm DNA damage measured with the Comet assay based on a descriptive model. A total of 137 patients participated in the study, between March 2016 and March 2017, to which a survey was conducted. The spermatogram and agarose gel electrophoresis of individual cells or Comet assay were performed, finding that patients with high-risk occupations (farmers, cooks, taxi drivers, welders, electricians, electronics and chemical workers) have more damage at the DNA level spermatic than low-risk patients (office staff, traders, inspectors, stevedores and teachers), the tail intensity was 44.72 ± 16.07 and 15.55 ± 16.51 respectively ($p = 0.0001$). In the case of patients with low-risk occupations, the tail intensity was 12.04 ± 15.33 for normozoospermic and 20.48 ± 17.12 for males with some altered seminal parameter, finding a significant difference ($p = 0.0175$). In addition, patients exposed to more occupational risk factors show greater damage at the level of sperm DNA than those not exposed (tail moment: $p = 0.0167$, tail intensity: $p = 0.0334$; tail length: $p = 0.0167$). It was evidenced that, the age and more years working in high-risk activities ($p < 0.05$), the greater the damage at the level of sperm DNA. In the present investigation, no significant differences were observed at the level of seminal parameters and occupation ($p \geq 0.05$). It is concluded that the sum of the occupational risk factors is associated with the damage in the sperm DNA and high-risk occupations present greater damage, therefore it is important that males of childbearing age have access to information on potential occupational risks and prevention to avoid exposure and preserve your reproductive health.

Key words: Infertility, sperm DNA fragmentation, Comet assay, occupations, tail intensity.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, las consultas por infertilidad han ido en aumento (OMS 2010), debido a un cambio radical en las pautas sociales del ser humano (Cortés *et al.* 2007). La infertilidad de una pareja está definida como la incapacidad de lograr el embarazo después de 12 meses de tener relaciones sexuales sin emplear métodos anticonceptivos (Seshagiri 2001, Nallella *et al.* 2006, Dey 2010). Se estima que entre el 15 al 20% de las parejas en el mundo buscan la ayuda de clínicas de fertilidad para poder concebir (Schmidt & Münster 1995, ESHRE Capri Workshop Group 2005). Casi el 28% de estas parejas presentan infertilidad inexplicable (Hull *et al.* 1985, Henkel *et al.* 2003) y 50% subyace al factor masculino (Morris *et al.* 2002, Ferlín *et al.* 2007).

En la última década, los valores de los parámetros seminales han ido en descenso debido a que la función reproductiva masculina es altamente sensible a cambios físicos y químicos (Younglai *et al.* 2005), y esto se ha demostrado con diversos estudios en los parámetros seminales, que son el diagnóstico primario y rutinario de la fertilidad masculina (Carlsen *et al.* 1992, Auger *et al.* 1995, Shine *et al.* 2008, OMS 2010). Otro punto importante es la integridad del ADN espermático para lograr la fertilización (Gutiérrez 2007, Aitken *et al.* 2009), el desarrollo del embrión, el correcto desarrollo fetal e incluso que el embarazo llegue a término (Sakkas 2011, Ribas *et al.* 2012). Otros estudios indican que, a mayor daño en el ADN espermático, menor es la posibilidad de embarazo natural (Irvine *et al.* 2000, Evenson *et al.* 2002).

El origen de la infertilidad masculina muchas veces se debe a factores ambientales (Sinawat 2000) como la exposición ocupacional, que tiene efectos sobre la calidad de semen (Jurewicz *et al.* 2009) y la integridad del ADN espermático (Duty *et al.* 2003, Sánchez-Pena *et al.* 2004, Miranda *et al.* 2015), mediante la inducción de daño oxidativo, la alquilación, fragmentación del ADN y otros tipos de daño que reducen la fertilidad (Schulte *et al.* 2010), estos daños a nivel de ADN no pueden ser detectados con el espermograma convencional (OMS 2010). Por ello, los riesgos ocupacionales juegan un papel importante en la salud reproductiva, por ser el trabajo la actividad que la especie humana realiza durante más tiempo en su vida y se ha detallado que la exposición a contaminantes químicos, hidrocarburos, metales pesados, plaguicidas (García 1999), temperaturas elevadas (Jung & Schuppe 2007), radiaciones electromagnéticas, sedentarismo, entre otros, generan alteraciones reproductivas, a nivel de espermatogénesis o metabolismo hormonal (Lepecka-Klusek *et al.* 2011) que

en algunos casos, podría generar infertilidad por incrementar la presencia de ADN dañado en los espermatozoides.

En el Perú, no existen estudios que evalúen los factores de riesgo ocupacional y sean asociados al daño en el ADN espermático y los parámetros seminales como la exposición a factores físicos y/o químicos que tienen los agricultores, jardineros, choferes, soldadores, cerrajeros, barnizadores, pintores, electricistas, policías de tránsito, expendedores de gasolina, panaderos, cocineros, operarios amoldadores, especialistas en sistemas, bomberos, obreros de mina, operarios metalúrgicos, técnicos de rayos X, odontólogos, entre otros (Yucra *et al.* 2008, García 1999, Lepecka-Klusek *et al.* 2011), lo que estaría generando una disminución en la fertilidad masculina de la población.

Un porcentaje elevado de pacientes varones que acuden al Instituto Nacional Materno Perinatal, Lima-Perú, presentan alguna alteración en sus parámetros seminales (Gutiérrez C, Sitio Web: Andina Noticias), pero no se sabe si hay o no daño en el ADN espermático, porque no realizan ninguna prueba para la detección y que el presente estudio pretende evaluar. Algunos estudios indican que el daño de ADN espermático está asociado con anomalías en los parámetros seminales convencionales (Acosta & Dueñas 2014). En otros casos, sin embargo, se ha visto que la integridad del ADN espermático es independiente de estos parámetros sugiriendo que su evaluación podría proporcionar información adicional (Irvine *et al.* 2000, Cortés *et al.* 2007, Saucedo *et al.* 2017). Además, se ha reconocido que el daño del ADN espermático puede ser la explicación de un elevado porcentaje de casos de infertilidad idiopática (Chohan *et al.* 2006).

Por lo expuesto, se considera de gran importancia conocer y determinar si existe asociación entre los factores de riesgo ocupacional y el daño del ADN espermático. Respondiendo al propósito, el ensayo cometa es una técnica para detectar el daño en el ADN de diferentes líneas celulares, y en la presente investigación se emplea para detectar el daño en el ADN espermático, por ser sencilla, altamente sensible a bajas concentraciones y poco tiempo de exposición a un determinado genotóxico, requiere de poca muestra, la colección de datos a nivel de células individuales permiten un análisis estadístico más robusto, permite evaluar un amplio rango de daños que se pueden ocasionar en el ADN, es relativamente rápida y económica (Chohan *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2010).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ESPERMATOZOIDE HUMANO

El espermatozoide humano es una célula especializada, diseñada para transmitir el genoma haploide a la descendencia. Cuenta con un potente flagelo que le permite desplazarse a través de un medio acuoso, es microscópico, carece de reservas y orgánulos citoplasmáticos innecesarios para la tarea de ceder el ADN al óvulo. A diferencia del óvulo que es el gameto femenino, es la célula más grande del cuerpo (mide aproximadamente 0.14 milímetros) y puede ser visible al ojo humano, inmóvil con reservas nutritivas como lípidos, proteínas y polisacáridos (Enciso 2009).

2.1.1. Estructura del espermatozoide, tamaño y forma

El espermatozoide está formado por tres regiones estructurales principales (Figura 1): la cabeza, pieza intermedia y cola (flagelo) y dos regiones funcionalmente diferentes, rodeadas por una misma membrana plasmática: la cabeza ovalada observado frontalmente con una longitud entre 4 y 5,5 μm , y un ancho de 2,5 a 3,5 μm , contiene un núcleo haploide extremadamente condensado y un acrosoma que ocupa entre 40% y 70% del área total de la cabeza y contiene enzimas lisosómicas como la hialuronidasa o proteolíticas como la acrosina que tienen la finalidad de digerir proteínas y glúcidos de la cubierta externa del gameto femenino. La pieza media contiene al centriolo y las mitocondrias que producen la energía necesaria para la movilidad (Mortimer 2005) y la cola que es una larga estructura filiforme de aproximadamente 50 μm de longitud, que impulsa al espermatozoide hacia el ovocito y le ayuda a penetrar a través de su envoltura. El ADN espermático es inactivo y está fuertemente empaquetado, de modo que su volumen está reducido al mínimo para su transporte (Gilbert 2003).

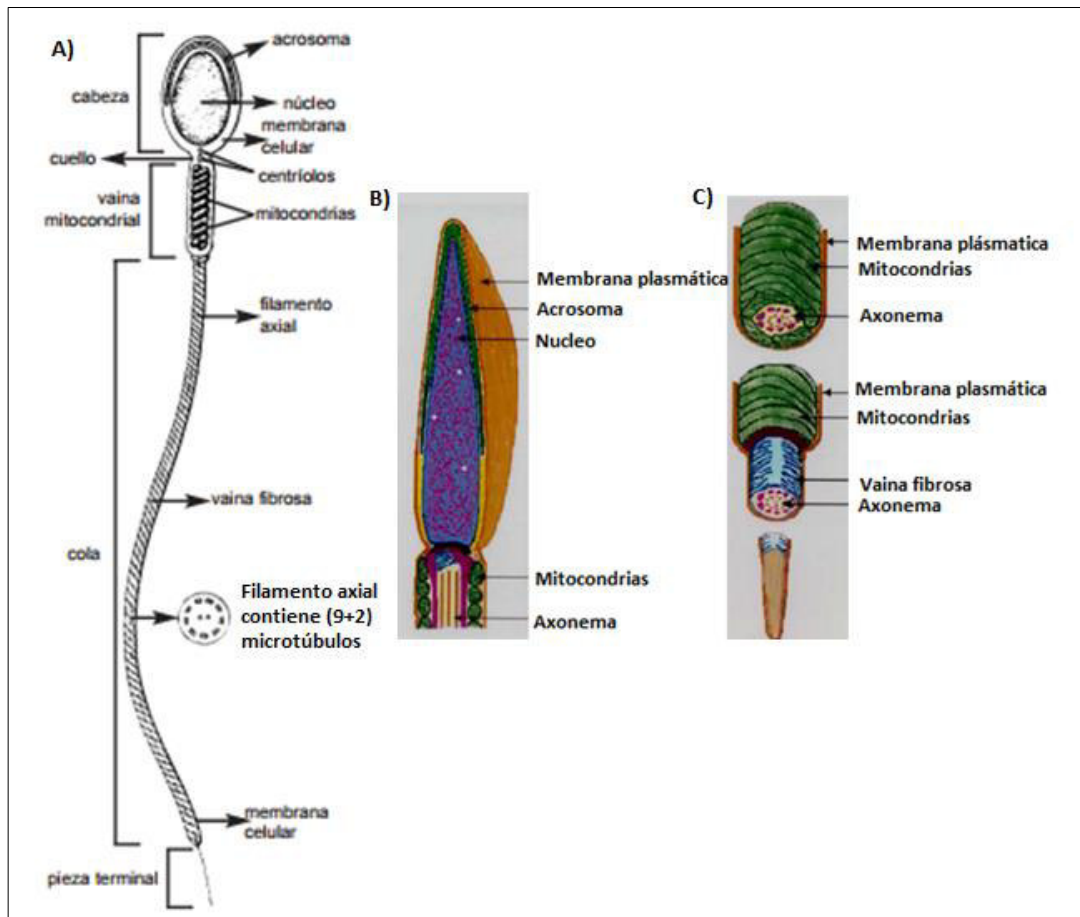


Figura 1. A) Principales elementos de un espermatozoide humano que son comunes en todas las especies de mamíferos (Hidalgo *et al.* 2005). B) Cabeza o pieza principal del espermatozoide. C) Cuello o pieza media de un espermatozoide visto transversalmente (Modificado y traducido de Amann & Pickett , 1987 y Wang 2007).

2.1.2. Espermatogénesis

En el varón, el proceso de producción de espermatozoides tarda aproximadamente 75 días (Málaga *et al.* 2005). Se trata de un proceso complejo de maduración y diferenciación celular, mediante el cual las células germinales indiferenciadas se transforman en espermatozoides (Figura 2). Sucede en el testículo a nivel de los túbulos seminíferos y se puede dividir en dos etapas principales: la primera llamada espermatocitogénesis, es el proceso en el que una espermatogonia sufre divisiones mitóticas. Las espermatogonias, se encuentran a lado de la pared de cada túbulo seminífero en los testículos, producen (división mitótica) dos células hijas diploides (A y B), donde la espermatogonia tipo B sufrirá la primera división meiótica y la espermatogonia de tipo A, seguirá con la división mitótica. La espermatogonia de tipo

B se llama espermatocono primario, y completa la primera división meiótica para producir dos células haploides llamados espermatoconitos secundarios. Estos continúan dividiéndose meióticamente (segunda división meiótica) para producir dos células haploides llamadas espermátidas. El desarrollo y la maduración de las espermátidas en espermatozoides (células maduras) se denomina espermiogénesis (Kierszenbaum 2001). La espermiogénesis es la segunda etapa que se produce en el compartimiento adluminal de los túbulos seminíferos, durante el cual el núcleo se remodela, se condensa, las histonas se sustituyen por las proteínas de transición y luego por protaminas (Málaga *et al.* 2005).

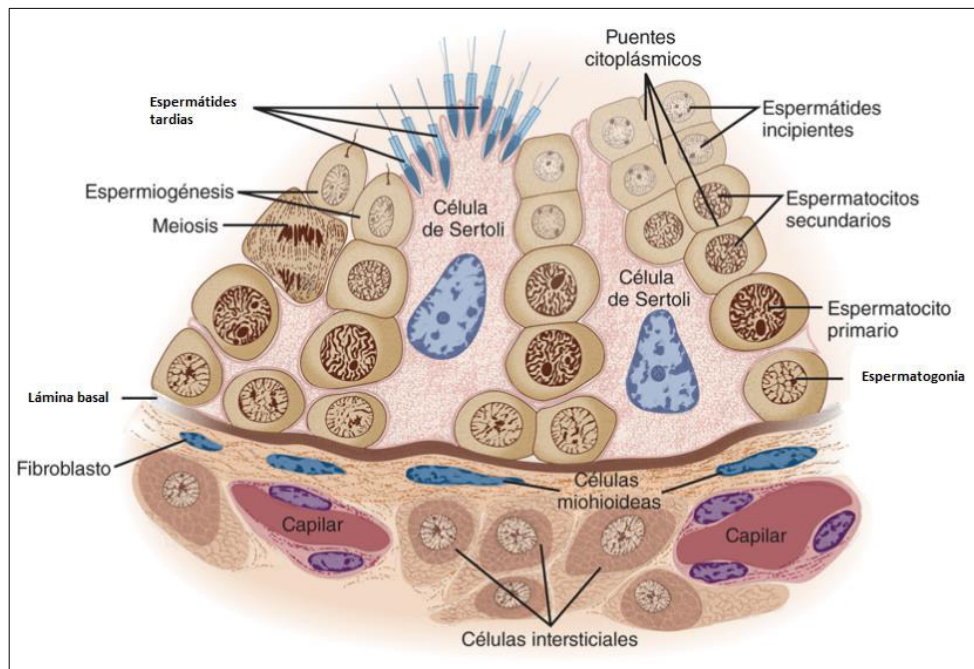


Figura 2. Espermatogénesis. Fuente: (Barrett *et al.* 2013). Fisiología médica.

2.2. ADN ESPERMÁTICO

El ADN del espermatozoide de los mamíferos se encuentra fuertemente condensado, hasta 6 veces más que el cromosoma mitótico (Braun 2001), como consecuencia de la sustitución de las histonas del nucleosoma por protaminas de transición y finalmente protaminas ricas en arginina, que le confiere una gran basicidad (Balhorn 1982). Existen dos tipos de protaminas: protamina P1 y la familia de las protaminas P2 (P2, P3 y P4, siendo la más abundante P2). Sin embargo, alrededor del 15% del ADN espermático permanece asociado con histonas convencionales (H2A, H2B, H3 y H4) (Oliva 2006). La maduración nuclear se da durante el tránsito en el epidídimo, y se

produce la formación de los enlaces disulfuro entre protaminas lo que hace a la cabeza del espermatozoide inflexible y asegura una mayor estabilidad (Dadoune 2003), siendo necesario para la penetración de la zona pelúcida del ovocito (Mortimer 2005), además las protaminas también podrían proteger el ADN espermático de agentes exógenos durante el tránsito por el tracto genital femenino manteniendo el genoma inactivo y podría desempeñar un papel muy importante según algunos estudios en la fertilización (Henkel *et al.* 2003, Tesarik *et al.* 2004) y desarrollo embrionario (Oliva 2006, Miller *et al.* 2010), al igual que las histonas reflejando marcas epigenéticas debido a la no sustitución de estas (Van der Heijden *et al.* 2008). También otros estudios mencionan que un espermatozoide con ADN fragmentado puede fertilizar a un ovocito, pero falla a otro nivel durante el embarazo (Twigg *et al.* 1998, Henkel *et al.* 2003, Henkel *et al.* 2004).

2.3. PARÁMETROS SEMINALES

La evaluación de la fertilidad masculina depende de la medición de los parámetros seminales convencionales (OMS 2010) que incluyen: **(I)** la concentración de espermatozoides (se determina mediante el uso de una cámara de *Neubauer*, los límites inferiores de referencia (LIR) para la concentración de espermatozoides y el número total de espermatozoides son 15×10^6 / ml y 39×10^6 respectivamente), **(II)** el volumen de semen (LIR 1.5 ml), **(III)** el porcentaje de espermatozoides móviles o mótils (la movilidad se clasifica en tres grupos: progresivos, no progresivo e inmóviles (Tabla 5). Los límites de referencia inferiores para la movilidad total y la movilidad progresiva son 40% y 32% respectivamente), **(IV)** el porcentaje de espermatozoides con forma normal (morfología anormal incluye defectos en la cabeza, el cuello, la pieza intermedia y el exceso de citoplasma residual. Según la OMS, el LIR para la morfología normal es de 4%) y **(V)** el porcentaje de espermatozoides vivos que, de acuerdo a la última versión del manual de la OMS para el examen de semen humano, el LIR es 58%. Cualquier alteración de estos parámetros seminales tiene una terminología que se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Denominación y descripción de patologías seminales según el manual de la OMS 2010.

Término	Detalle
Normozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de movilidad progresiva y morfología normal igual o por encima del límite inferior de referencia (LIR).
Aspermia	Ausencia de semen (o eyaculación retrógrada).
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
Oligozoospermia	Concentración por debajo del LIR.
Astenozoospermia	Porcentaje de movilidad progresiva por debajo del LIR.
Oligoastenoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de movilidad progresiva por debajo del LIR.
Oligoastenoteratoospermia	Número total de espermatozoides y porcentajes de movilidad progresiva y morfología normal por debajo del LIR.
Oligoteratoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de morfología normal por debajo del LIR.
Astenoteratoospermia	Porcentaje de movilidad progresiva y morfología por debajo del LIR.
Teratoospermia	Porcentaje de morfología normal debajo del LIR.
Criptoospermia	Espermatozoides no observados en el eyaculado en fresco, pero si en el pellet tras el centrifugado.
Hematoospermia	Presencia de eritrocitos en el eyaculado.
Leucocitospermia	Presencia de leucocitos en el eyaculado por encima de LIR.
Necroospermia	Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.

2.4. INFERTILIDAD MASCULINA

El 55% a 70% de los casos de no concepción por el factor de infertilidad masculina (Figura 3) son causados por criptorquidia (descenso incompleto de los testículos),

varicocele (dilatación anormal de las venas espermáticas), causas genéticas (aberraciones cromosómicas, deleciones cromosómicas y mutaciones genéticas), hipogonadismo, enfermedades hipogonadotróficas (hipotálamo o pituitaria), autoanticuerpos contra los espermatozoides, infecciones y las enfermedades sistémicas (paperas, tuberculosis, clamidia, cirrosis hepática) (Irvine 1998). Además, ciertos medicamentos pueden afectar la fertilidad, especialmente los del tratamiento del cáncer, antiandrógenos, antihipertensivos, bloqueadores de los canales de calcio. El 30% a 45% restante de los casos de infertilidad masculina se considera idiopáticas (Irvine 1998) y de estos casos el 80% corresponde a la fragmentación elevada del ADN espermático (Lewis 2013). Estos varones vienen a consulta con resultados normales en la exploración física y las pruebas endocrinológicas.

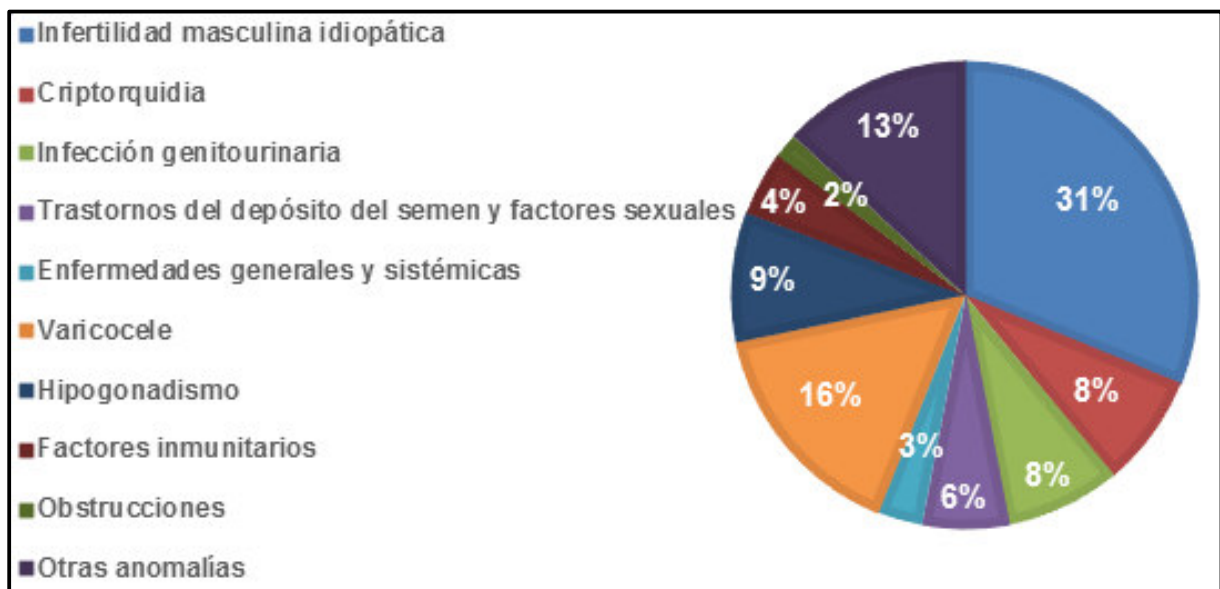


Figura 3. Factores asociados a infertilidad masculina. Guía clínica sobre la infertilidad masculina. Fuente: Dohle *et al.* 2010.

Muchos estudios han informado una posible asociación entre la baja calidad del semen con el estilo de vida como el tabaquismo, el consumo de alcohol, índice de masa corporal alto (IMC) (Dupont *et al.* 2013), exposiciones ambientales, exposiciones ocupacionales a agentes físicos, químicos y otros (Magnusdottir *et al.* 2005).

Un artículo de revisión sobre las exposiciones ocupacionales y la fertilidad masculina mencionan que muchos agentes físicos y químicos pueden afectar negativamente a

los parámetros seminales incluyendo, el calor, la radiación, las vibraciones mecánicas, pesticidas, plomo y algunos solventes orgánicos (Tas *et al.* 1996).

También algunas ocupaciones como soldadura, conducción de larga distancia, agricultura, pintores, trabajadores de oficina con exposición a calor, fundición o panadería, trabajadores con exposición a radiación ionizante, el plomo inorgánico, dibromuro de etileno, algunos éteres de glicol de etileno, disulfuro de carbono, entre otros, puede perjudicar la función reproductora masculina, correlacionándose con la baja calidad espermática (Jensen *et al.* 2006, Song & Seo 2006).

2.5. DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO

La integridad del ADN espermático es importante para la transmisión de la información genética, actualmente el daño en el ADN espermático, aún no se comprende a la perfección pero se generan hipótesis que el daño se produce por factores intrínsecos como por rupturas en las cadenas de ADN (Figura 4) durante la remodelación de la cromatina espermática y la apoptosis durante la espermiogénesis; la fragmentación inducida principalmente por especies reactivas de oxígeno (EROs), durante el transporte a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo, e inducido por caspasas y endonucleasas endógenas; también por factores extrínsecos tales como la radiación ionizante y exposición ambiental (Sakkas 2011, Sakkas & Álvarez, 2010, Stocks *et al.* 2010). Los espermatozoides tienen altos niveles de fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos saturados y poliinsaturados, convirtiéndolos en células particularmente susceptibles al daño (Álvarez & Storey 1995).

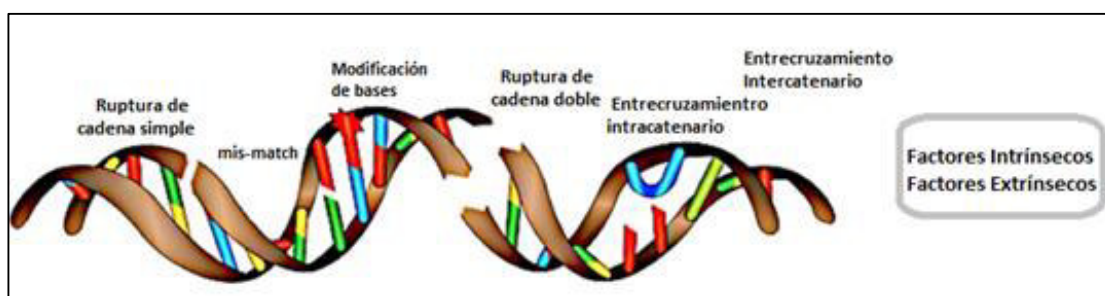


Figura 4. Resumen de las principales causas de daño en el ADN. Fuente: Álvarez & Gosálvez (2011), Ward (2011).

2.6. MECANISMOS QUE INDUCEN AL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO

a) Fragmentación del ADN durante el proceso de espermiogénesis

Las alteraciones en la compactación, remodelación de la cromatina durante el proceso de espermiogénesis podrían resultar en la fragmentación del ADN y pueden originarse en cualquiera de los cuatro niveles de empaquetamiento, siendo los más comunes en el reemplazo de histonas por protaminas. Estas alteraciones se podrían producir previo a la espermiación y es probable que estos espermatozoides sean más susceptibles a daños post-testiculares (Marcon & Boissonneault, 2004).

b) Defectos en el mecanismo de la apoptosis durante el proceso de espermiogénesis

La función principal de la apoptosis es limitar la población de células germinales a cantidades que puedan ser toleradas por las células de Sertoli, y la segunda eliminar los espermatozoides defectuosos, durante el proceso de espermatogénesis. Aproximadamente un 50% a 60% de todas las células germinales que entran en meiosis I son inducidas a la apoptosis (Sakkas & Álvarez 2010).

c) Daño post-testicular del ADN

Algunos estudios mostraron que los espermatozoides inmaduros producen altos niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) y pueden inducir daño en el ADN de los espermatozoides maduros. Las EROs son importantes, se requieren bajas concentraciones para determinados procesos celulares y debido a su corta vida media son inofensivas. Sin embargo, el estrés oxidativo se produce como consecuencia de un exceso de los radicales libres y fallas en los mecanismos antioxidantes que ayudan a mantener el equilibrio (Wright 2014).

Este daño se produce después de la espermiación y durante la migración de los espermatozoides (Figura 5) desde los túbulos seminíferos a los epidídimos (Ollero *et al*, 2001). Las EROs pueden dañar el ADN del espermatozoide, directa o indirectamente a través de la activación de las caspasas y endonucleasas del espermatozoide. Por otro lado, las células epiteliales del epidídimo también podrían desempeñar un papel activo en el daño al ADN inducido por EROs o por la activación

de las caspasas y endonucleasas espermáticas a través de factores físico-químicos tales como altas temperaturas (Banks et al, 2005) o factores ambientales (Rubes *et al*, 2007).

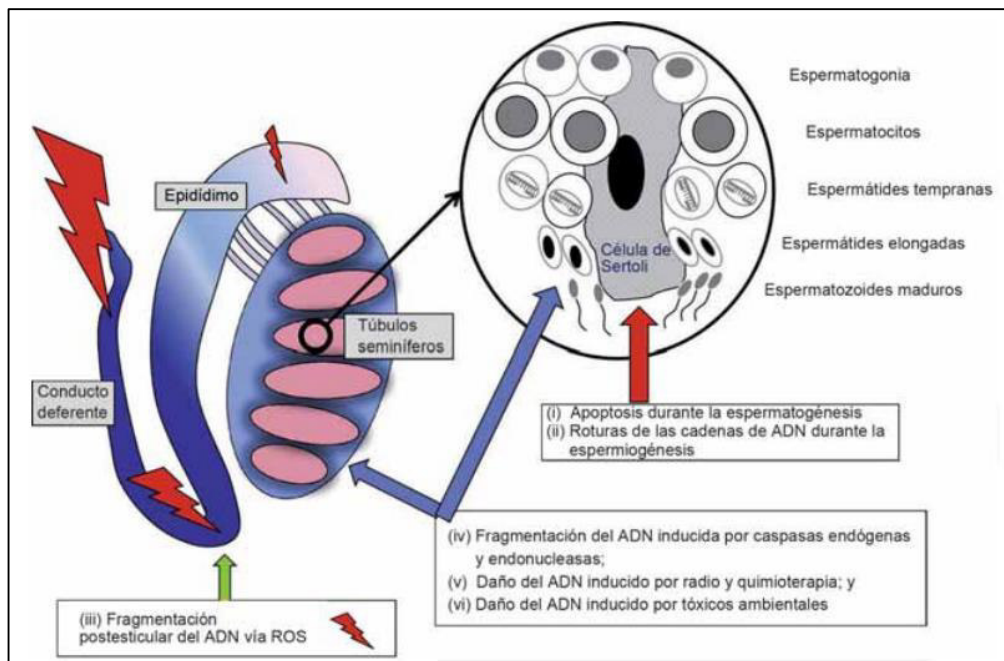


Figura 5. Mecanismos principales de inducción de daño al ADN en espermatozoides durante la producción o el transporte de las células. Fuente: Sakkas & Álvarez 2010.

2.7. LA FRAGMENTACIÓN DE ADN Y LA OCUPACIÓN

En la actualidad, los problemas de fertilidad en países con industrialización intensiva, urbanización, superpoblación, incremento en la utilización de sustancias químicas, etc. son más notables. A su vez, las condiciones de vida desempeñan un papel significativo en la espermatogénesis y el metabolismo hormonal. La asociación entre la ocupación y la fertilidad masculina no ha sido totalmente explicada, siendo estudio de interés para los investigadores (Tabla 2), como la exposición a los ftalatos (producto químico multifuncional utilizado ampliamente en los productos plásticos) se ha asociado con un aumento de las rupturas de doble cadena, medido por el ensayo cometa neutral (Hauser *et al.* 2007), temperaturas elevadas por un entorno laboral inapropiado (Oliva *et al.* 2001), exposición a estireno, utilizado en la fabricación de plásticos, revestimientos, protectores, cauchos sintéticos) medido por el ensayo cometa alcalino (Migliore *et al.* 2002) e insecticidas que se asociaron con un aumento

en el daño del ADN espermático medido por el ensayo cometa neutral (Meeker *et al.* 2008).

Tabla 2. Estilo de Vida y daño del ADN. Fuente: Wright *et al.* 2014

Estilo de vida	Resultados
Organofosforados	Marcado aumento en el porcentaje de fragmentación del ADN (> 30%) en los trabajadores expuestos.
Radiación del teléfono celular	No hay estudios específicos sobre la fragmentación del ADN, el aumento de EROs y disminución de antioxidantes.
PCB: Aplicación industrial	La correlación positiva entre exposición y el porcentaje de fragmentación del ADN.
Bisphenol A: Poliestireno	Tendencia significativa de aumento de daño en el ADN y concentraciones elevadas de bisfenol A en la orina.
Calor	Aumento de la fragmentación del ADN con el aumento de 2-3 °C en la temperatura.
Conducir	Aumento en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado.

PCB = Bifenilos Policlorados.

2.7.1. Detección del daño del ADN espermático

El espermatograma es la base de la evaluación de la fertilidad masculina, pero en la actualidad existen marcadores que permiten discriminar mejor entre pacientes fértiles e infértiles, y sirven para predecir los resultados en el potencial de fertilidad. Las técnicas disponibles para detectar el daño en el ADN espermático son muy variables: el ensayo TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling), ensayo SCD (Sperm Chromatin Dispersion), SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), el ensayo DBD – FISH (Breakage Deteccion - Fluorescence In Situ Hibridization), el ensayo Naranja de Acridina y el ensayo cometa también llamado técnica SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) (Singh & Stephens 1997).

Cada técnica tiene una función similar de identificar daños a nivel de ADN espermático. Uno de los tipos más peligrosos de daño en el ADN es la ruptura de doble cadena (RDC). Aunque hay dos mecanismos para reparar las RDC, este daño

puede conducir a la muerte celular o mutaciones. Las rupturas individuales o simples no son consideradas de alta peligrosidad, ya que se pueden reparar con la otra cadena de ADN como molde, además podría llegar a ser reparada por un ovocito sano y joven (Quintero *et al.* 2015). Técnicas como Sperm Chromatin Dispersion (SCD), el Ensayo Cometa entre otras comprueban rupturas como indicadores de la integridad del ADN en el espermatozoide humano (Quintero *et al.* 2015)

2.7.2. Mecanismos de reparación

En la espermatogénesis, existen procesos de reparación del ADN espermático, estos mecanismos son necesarios para reparar rupturas inducidas o de cadena, de manera que se dé una correcta remodelación de la cromatina, que durante la condensación nuclear en el epidídimo no se realiza y la última oportunidad se daría esperando que el ovocito sea capaz de reparar los daños del ADN espermático de lo contrario el embrión sufriría importantes consecuencias (Wright *et al.* 2014).

Hay diferentes tipos de daño en el ADN causado por diferentes agentes, y existe una variedad de mecanismos de reparación del ADN, que trabajan para prevenir la apoptosis celular y la formación de mutaciones (Schulte *et al.* 2010).

Hay dos mecanismos para reparar las RDC, la recombinación homóloga (HR) y la recombinación no homóloga (NHEJ). La HR requiere la secuencia homóloga para guiar la reparación y esto es proporcionado por la cromátide hermana. La HR también se considera que es libre de errores y es la principal vía para reparar RDC durante la fase S y la fase G2 del ciclo celular (Sung & Klein 2006). La NHEJ se considera propenso a errores y por lo general ocurre durante la fase G1 sin requerir una secuencia homóloga intacta. La NHEJ simplemente tiene los extremos rotos y luego se unen (Hefferina & Tomkinson 2005). Cuando estos mecanismos fallan, solo queda detectar el daño por las diversas técnicas existentes.

2.8. ENSAYO COMETA

Se empleó por primera vez para determinar el daño en células somáticas (Ostling & Johanson 1984) y se basa en la resistencia diferencial que ofrecen las moléculas de ADN de distintos tamaños cuando se mueven a través de un gel sometidas a un campo eléctrico (Figura 6). La modificación del protocolo para espermatozoides fue propuesta por (Hughes *et al.* 1997) por la extrema condensación. En este método, las células están incrustadas en agarosa sobre un portaobjetos (Figura 7), luego pasan por una solución que contiene detergente y alta concentración de sal para eliminar todos los componentes celulares y las histonas excepto el ADN. Después, el portaobjetos se sumerge en soluciones de pH alcalino o neutral y se pasa a un tanque con buffer de electroforesis el cual permitirá el desenrollamiento del ADN, luego se corre la electroforesis durante 20 minutos (en células somáticas). El tampón de lisis usado para las células somáticas no puede eliminar las protaminas que rodean el ADN en el esperma y, por lo tanto, la Proteinasa K y el Ditiotreitól (DTT) debe añadirse para eliminar las protaminas (Singh *et al.* 1988, Singh *et al.* 1989). Mediante esta técnica las células adquieren una morfología semejante a un cometa, en la cual la cabeza del cometa representa el ADN intacto y la cola los fragmentos del ADN que han migrado. Uno de los dos tipos de este ensayo es la electroforesis alcalina que puede detectar rupturas de cadena sencilla, de doble cadena y lugares lábiles alcalinos. La técnica es muy sensible ya que puede medir el daño real, es decir puede detectar bajos niveles de daño al ADN (Valverde & Rojas 2009).

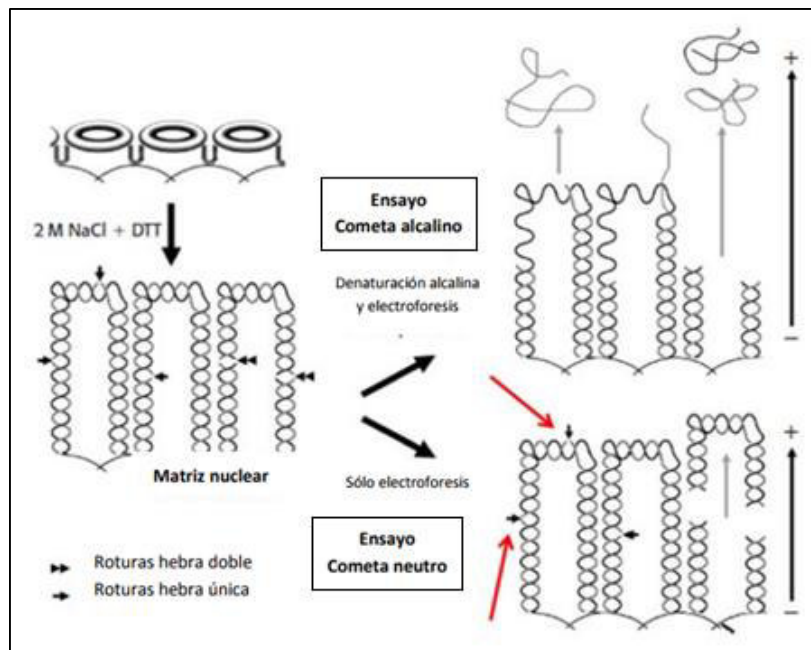


Figura 6. Ensayo cometa neutro y alcalino. Fuente: Shaman & Ward 2006.

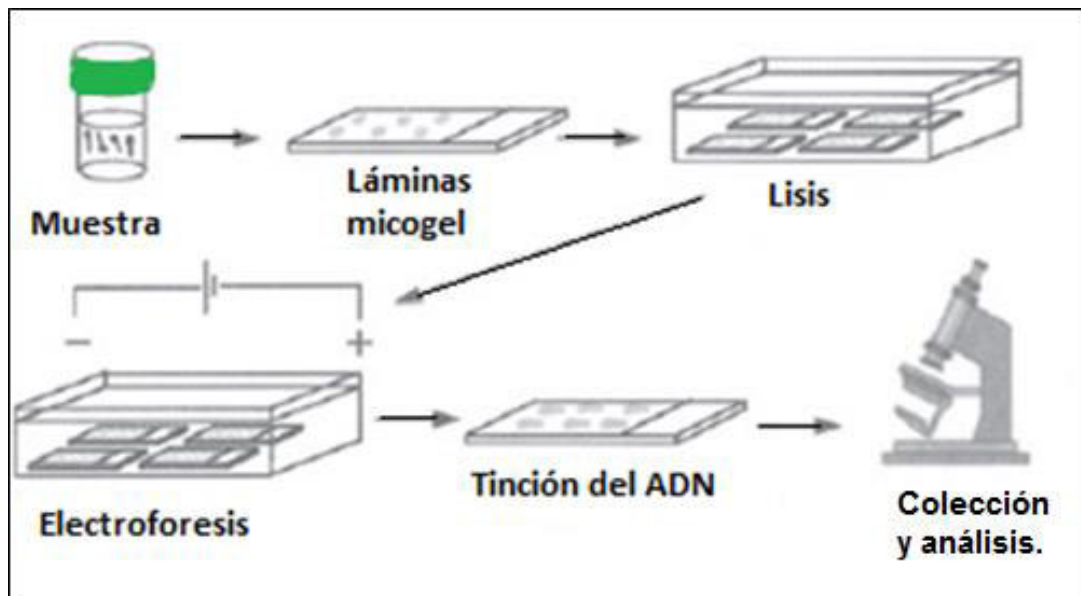


Figura 7. Metodología del ensayo cometa. Fuente: Haines *et al.* (1998) y Hughes *et al.* (1997).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la asociación entre los factores de riesgo ocupacional y el daño del ADN espermático en pacientes con problemas de fertilidad atendidos en Lima-Perú utilizando el ensayo Cometa alcalino.

3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Describir el grupo de estudio y establecer los factores de riesgo ocupacional.
- Contribuir a la validación de la técnica del Ensayo Cometa para espermatozoides humanos y establecer los parámetros en el grupo de estudio.
- Determinar si el daño en el ADN espermático se produce por los factores de riesgo ocupacional, y conllevan a un problema de infertilidad.
- Determinar la frecuencia de pacientes con mayor daño en el ADN espermático según ocupación.
- Evaluar si existe correlación entre el daño en el ADN espermático medido por el ensayo Cometa Alcalino y los parámetros seminales del espermatograma de los pacientes del estudio.

3.3. HIPÓTESIS

H₁: Los factores de riesgo ocupacional están asociados al daño en el ADN espermático en pacientes con problemas de fertilidad.

H₀: Los factores de riesgo ocupacional no están asociados al daño en el ADN espermático en pacientes con problemas de fertilidad.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El Instituto Materno Perinatal, el cual en su nueva Unidad de Medicina Reproductiva atiende de 15 a 20 casos diarios, de los cuales el 40% requiere de fertilización *In Vitro* (Gutiérrez C, Sitio Web: Andina Noticias). Los varones en su mayoría tienen problemas en sus parámetros seminales, además de tener ocupaciones que podrían estar dañando la salud reproductiva masculina como taxistas, choferes, soldadores, albañiles, etc.

El presente estudio se llevó a cabo con muestras de pacientes atendidos en el Instituto Nacional Materno Perinatal (INMP), Centro de Fertilidad y Reproducción Asistida (CEFRA) y participantes adicionales (Esquema 1) durante el periodo comprendido entre marzo del 2016 y marzo del 2017.

4.2. TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo transversal, es un estudio observacional y descriptivo, que mide una exposición y el efecto en una muestra poblacional en un solo momento temporal.

4.3. TIPO DE MUESTREO

No Probabilístico, técnica de muestreo que permite seleccionar muestras basadas en un juicio subjetivo en lugar de hacer la selección al azar.

4.4. MATERIALES DE LABORATORIO

Reactivos:

- ✓ Peróxido de Hidrógeno, 30% (BAKER ANALYZED).
- ✓ Agarosa regular para electroforesis (Sigma-Aldrich).
- ✓ Agarosa de bajo punto de fusión (Sigma-Aldrich).
- ✓ EDTA disódico (Sigma-Aldrich).

- ✓ Cloruro de Sodio (Sigma-Aldrich).
- ✓ Etanol absoluto 99.9% (Merck).
- ✓ Triton® X100 (Merck).
- ✓ Dimetil Sulfóxido (Merck).
- ✓ Ditioneitol (Thermo Scientific™).
- ✓ Proteína K, Fungal (Invitrogen™).
- ✓ Cloruro de Calcio (BAKER ANALYZED).
- ✓ Glicerina líquida.
- ✓ Ácido Clorhídrico (Merck).
- ✓ Hidróxido de Sodio (Merck).
- ✓ SBYR Gold (Invitrogen™).
- ✓ Eosina (FertiPro).
- ✓ Spermac Stain (FertiPro)

Materiales:

- ✓ Tubo centrífuga de plástico fondo cónico 15 ml
- ✓ Tips amarillo 10 µl - 100 µl
- ✓ Tips azul 100 µl - 1000 µl
- ✓ Láminas portaobjetos
- ✓ Láminas cubreobjetos 22x22 mm
- ✓ Láminas cubreobjetos 22x60 mm
- ✓ Microtubo de polipropileno 0.6 ml
- ✓ Microtubo de polipropileno 1.5 ml
- ✓ Frasco de plástico boca ancha estériles con tapa verde

Equipos:

- ✓ Centrífuga (ZELIAN)
- ✓ Cámara de electroforesis (THERMO SCIENTIFIC)
- ✓ Microscopio campo claro (MOTIC)
- ✓ Microscopio de fluorescencia (MOTIC-VELAB)
- ✓ Incubadora (THERMO SCIENTIFIC)
- ✓ Computadora con el programa COMET ASSAY V

4.5. POBLACIÓN Y MUESTRA

De acuerdo con el programa para análisis epidemiológico de datos Epidat (recomendado por la Organización Panamericana de la Salud) y el efecto de diseño 1 (Tabla 3), se calculó la muestra a partir de una población de un tamaño de 150, a un nivel de confianza del 95%, siendo la proporción esperada del 64.9% (Acosta & Dueñas, 2014).

Tabla 3. Tamaño de muestra y precisión del estudio.

Tamaño de muestra	Precisión (%)
130	3
63	9
31	15

4.6. GESTIÓN DE PACIENTES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

Pacientes que después de 12 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos y no lograron el embarazo fueron reclutados en la unidad de Salud Reproductiva del INMP y CEFRA, Lima, Perú. Para la participación en el estudio, después del llenado del pre-cuestionario y cuestionario (Ver anexo N° 2) se les informó a los pacientes que debían llenar un consentimiento informado, proporcionado por el INS (Ver anexo N° 1). Sin embargo, algunos pacientes (n=19) no quisieron llenar el consentimiento para evitar colocar sus nombres. Como criterio de inclusión (Portella *et al.* 2014), se consideró a los pacientes que emitieron muestras seminales para su primer estudio de espermograma menores a 55 años con el respectivo llenado del pre-cuestionario en los cuales mencionaron que se consideraban personas saludables y como criterios de exclusión (Valverde & Rojas 2009) fueron: atrofia testicular, criptorquidia, azoospermia, varicocele, historia de quimioterapia o radioterapia, diabetes, enfermedades cardiovasculares, alcoholismo (definido como el consumo de 3 o más vasos de bebidas alcohólicas, 3 o más veces por semana), tabaquismo (definido como el consumo de 1 o más cigarros al día, 3 o más veces por semana) y mayores de 55 años. En total 10 pacientes excluidos (Esquema 1).

El manejo de los datos fue basado en los principios de confidencialidad y solo de acceso exclusivo al investigador principal. El presente trabajo y el consentimiento informado (Ver Anexo N° 1) cuentan con la aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Salud (Resolución Directoral N° 193-2016-OGITT-OPE/INS) y por el comité de ética del Instituto Nacional Materno Perinatal (CARTA N° 030-2016-DG-N° 017-OEAIDE/INMP).

4.7. ESTRUCTURA DEL CUESTIONARIO (DETERMINACIÓN DE FACTORES DE RIESGO OCUPACIONAL)

El cuestionario de factores de riesgo ocupacional fue diseñado siguiendo las recomendaciones adaptadas del programa de accidentes de trabajo EPINET - Organización Panamericana de la Salud (aclarando que estas listas son complementarias, pero no completas ni exactas y tienen un respaldo mundial) para agrupar las ocupaciones. El pre-cuestionario y parte del cuestionario se desarrollaron según Altakroni (2014). El cual incluía preguntas acerca del estilo de vida y actividades en el trabajo (Factores de riesgo ocupacional, tiempo de trabajo, tipo de protección) (Ver Anexo N° 2). Se siguieron las recomendaciones de Arribas (2004), los cuestionarios fueron aplicados por el investigador principal: Antuane W. Zevallos Murgado, en las instalaciones de los respectivos centros mediante una encuesta dirigida. En algunas ocasiones el personal del INMP dirigió el pre-cuestionario.

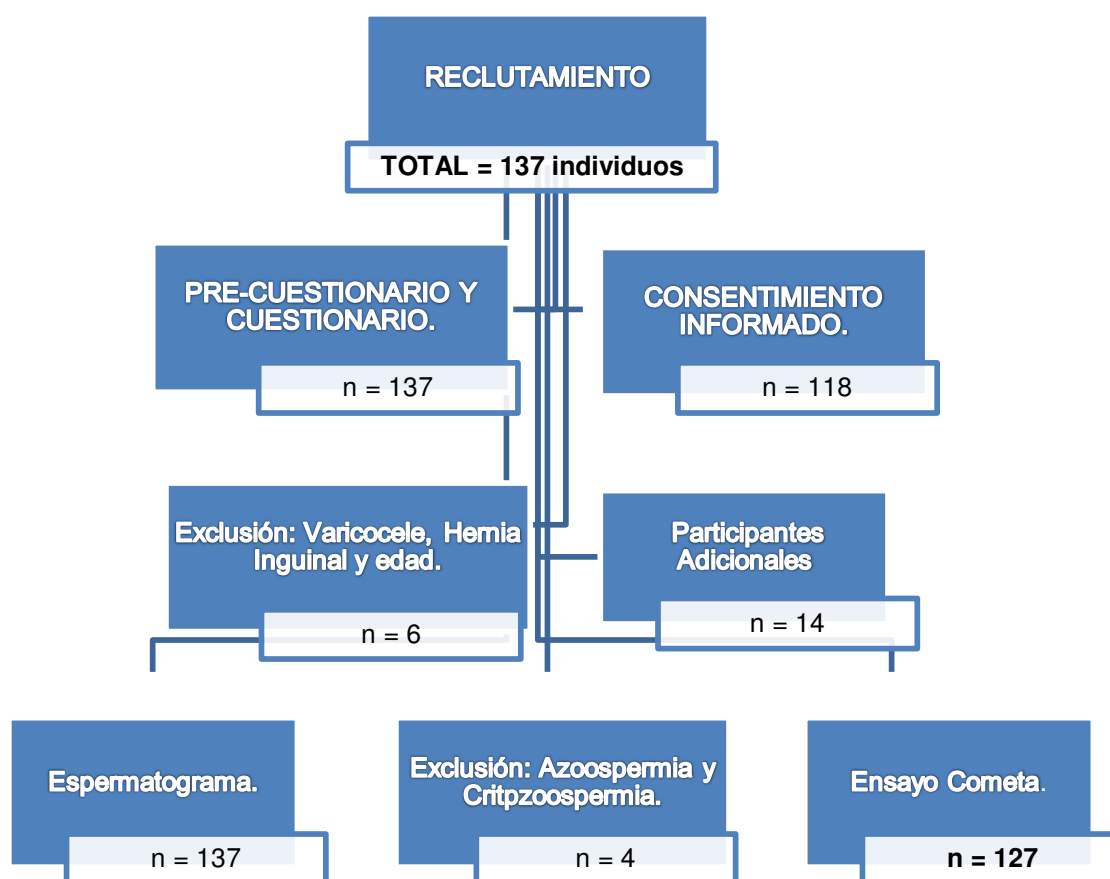
4.8. MATERIAL BIOLÓGICO

La muestra de semen fue obtenida por masturbación luego de una abstinencia sexual de mínimo 3 y máximo 7 días en recipientes de plásticos descartables estériles de boca ancha con nombre, hora de colecta y código del paciente.

4.9. LUGAR DE MUESTREO

Las muestras fueron colectadas en un área especial del INMP, CEFRA o INS, según fue el caso. En el caso de los pacientes adicionales (Esquema 1), que emitieron muestra fuera del centro, el tiempo de traslado no excedió la hora después de la emisión.

Esquema 1. Gestión de pacientes para el estudio.



Para diferenciar a todos los individuos que participaron, a partir de ahora se denomina pacientes a aquellos que han sido atendidos por problemas de fertilidad y participantes adicionales a aquellos que fueron contactados para el estudio.

4.10. MÉTODOLOGÍA

Los pacientes con orden médica del INMP, CEFRA o en el caso de los participantes adicionales (Esquema 1) sin orden médica (n=14), acudieron al respectivo centro previa cita. Se les brindó ciertas recomendaciones para la prueba (4.11.a). Después de la emisión de la muestra en el centro o fuera del centro (el tiempo de traslado no excedió la hora después de la emisión) llenaron el pre-cuestionario, cuestionario (n=137) y el consentimiento informado (n=118), sin obligación.

El espermatograma se realizó en la unidad de Citogenética del INMP, laboratorio de Andrología de CEFRA o en el INS-CENSOPAS. Luego se cuantificó la fragmentación

del ADN espermático por el ensayo Cometa en 127 individuos (muestra fresca y total), las muestras fueron parcialmente procesadas (Láminas en lisis) y fueron trasladadas al INS para terminar el ensayo, respetando la cadena de frío (2-8°C).

La edad media de todos los individuos que participaron fue de 37.39 años (Rango 20-55 años). Las muestras fueron agrupadas de acuerdo a la normalidad (n = 58) y alteraciones en sus parámetros seminales (n = 69); según edad (Tabla 4). Los parámetros seminales que se evaluaron fueron: volumen, movilidad, vitalidad, concentración y morfología (4.11.b). Considerándose como muestra con alteración, a aquella, que presentó al menos 1 de los 5 parámetros considerados, por debajo de los límites inferiores de referencia: Hipospermia, Oligozoospermia, Teratozoospermia, Astenozoospermia y Necrozoospermia.

Tabla 4. Sub-grupos de pacientes por edad.

NORMOZOOSPERMICOS		
G1 (20-30 años)	G2 (31-40 años)	G3 (41-55 años)
PARÁMETROS SEMINALES ALTERADOS		
G1 (20-30 años)	G2 (31-40 años)	G3 (41-55 años)

4.11. ESPERMATOGRAMA

El espermatograma permitió evaluar los parámetros físicos tales como la licuefacción, y las características macroscópicas del semen (volumen, viscosidad, color, presencia de coágulos gelatinosos) además del parámetro químico para determinar la alcalinidad (pH). También se evaluaron las características microscópicas (concentración en cámara de Neubauer®, movilidad, vitalidad con tinción eosina, morfología con los criterios de Kruger, presencia de otros tipos celulares) con magnificación 400X en microscopio de campo claro, en cada parámetro se evaluó 200 células. Los análisis se realizaron siguiendo los criterios de la OMS.

a) Obtención de la muestra

Se entregó al paciente las indicaciones en forma escrita y oral para la obtención de la muestra:

- Método de colecta: Masturbación.
- Frasco estéril de boca ancha, tapa verde o azul.
- Días de abstinencia: 3-7 días.
- Asegurarse que todo el volumen se deposite en el frasco (esencial para un correcto análisis).
- Tiempo máximo desde la colecta hasta llegar al laboratorio: 40 minutos.
- El traslado a temperatura corporal entre 30-37 °C.
- Se rotuló el frasco con el nombre y hora de colecta de la muestra.

b) Metodología del Espermatograma (OMS 2010)

El espermatoograma se realizó entre los 30-60 minutos después de emisión de la muestra. Tiempo necesario para una completa licuefacción, luego se mezcló suavemente el semen con un movimiento rotatorio para reducir el error en la determinación de los parámetros.

- Examen macroscópico (características físico-químicas):

Paso 1: Se observó la muestra seminal verificando la licuefacción (sea parcial o total) con la ayuda de una pipeta Pasteur, además se verificó la presencia de hilos de moco y se tomó nota del color (gris opalescente u amarillento).

Paso 2: Con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico se verificó la viscosidad (sea normal o aumentada).

Paso 3: Se midió el volumen de la muestra seminal con un tubo cónico graduado o con una pipeta Pasteur de plástico graduada.

Paso 4: Se midió el pH con una tira indicadora.

- Examen microscópico

Paso 5: Se observó al microscopio la movilidad (se colocó 10 µl del semen en una lámina portaobjetos y se colocó encima una lámina cubreobjetos), se contó como mínimo 200 espermatozoides agrupándolos en progresivos, no progresivos e inmóviles (Tabla 5). Además, se observó en esos campos la presencia o no de aglutinaciones espermáticas.

Tabla 5. Agrupación de los espermatozoides según su movilidad.

Progresivos	Con movimiento rectilíneo, rápido o lento.
No progresivos	Sin desplazamiento, movimiento in situ.
Inmóviles	Inmovilidad.

Paso 6: Se observó al microscopio la vitalidad (se mezcló 10 µl de eosina + 10 µl de muestra de semen, de la mezcla se colocó 10 µl en un portaobjetos de la misma forma que la movilidad), se contó como mínimo 200 espermatozoides agrupándolos en coloreados (rosados) como muertos y sin colorear como vivos.

Paso 7: El recuento de espermatozoides se realizó con una cámara de *Neubauer* (Figura 8) después de la dilución (1:2, 1:5 y 1:20 dependiendo del primer conteo, paso 5) en solución *Macomber* y *Saunders*, que da muerte a los espermatozoides para evitar un mal recuento; además se realizó el conteo de células redondas, se tomó nota de cuantas células redondas se encuentran en 400 espermatozoides contados.

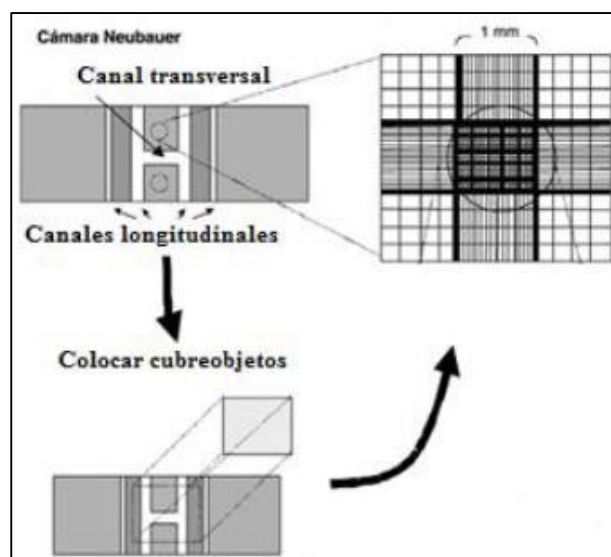


Figura 8. Estructura de la Cámara de *Neubauer* y lugar de colocación de la muestra.
Fuente: OMS (2010).

Paso 8: Por último, se realizó un frotis con 10 μl de semen, colocando la lámina preparada en coloración SPERMAC STAIN (marca comercial FertiPro), se contaron 200 espermatozoides, evaluando la normalidad y anormalidad de acuerdo a su morfología en cabeza, cuello, cola o anomalías combinadas siguiendo el **criterio de Kruger** (OMS 2010).

Criterio de Kruger

La morfología espermática se realizó observando diferentes campos elegidos al azar bajo microscopio óptico de campo claro (MOTIC-BA-310) a 1000x, con aceite de inmersión. Fueron evaluados 200 espermatozoides.

La evaluación de las anormalidades en la morfología debe incluir defectos de la cabeza, cuello y/o cola. Un espermatozoide inmaduro se evalúa con la presencia de gotas citoplasmáticas mayores a $1/3$ o a $1/2$ del tamaño de una cabeza normal.

Para que un espermatozoide sea considerado normal, la cabeza debe ser ovalada, con una longitud aproximada entre 4 a 5 μm y un ancho entre 2,5 a 3,5 μm ; la región acrosomal debe ocupar entre el 40% y el 70% de la cabeza; el cuello debe tener un ancho menor de 1 μm y una longitud aproximada de una cabeza y media del espermatozoide ($\geq 5 \mu\text{m}$). La cola debe ser derecha, uniforme, más estrecha que el cuello, debe estar desenrollada y medir aproximadamente 45 μm de largo. Las vacuolas deben ocupar menos del 20% de la cabeza. Los espermatozoides se deben

clasificar como: normales, con defecto en la cabeza, con defecto en el cuello o con defecto en la cola.

4.12. METODOLOGÍA DEL ENSAYO COMETA

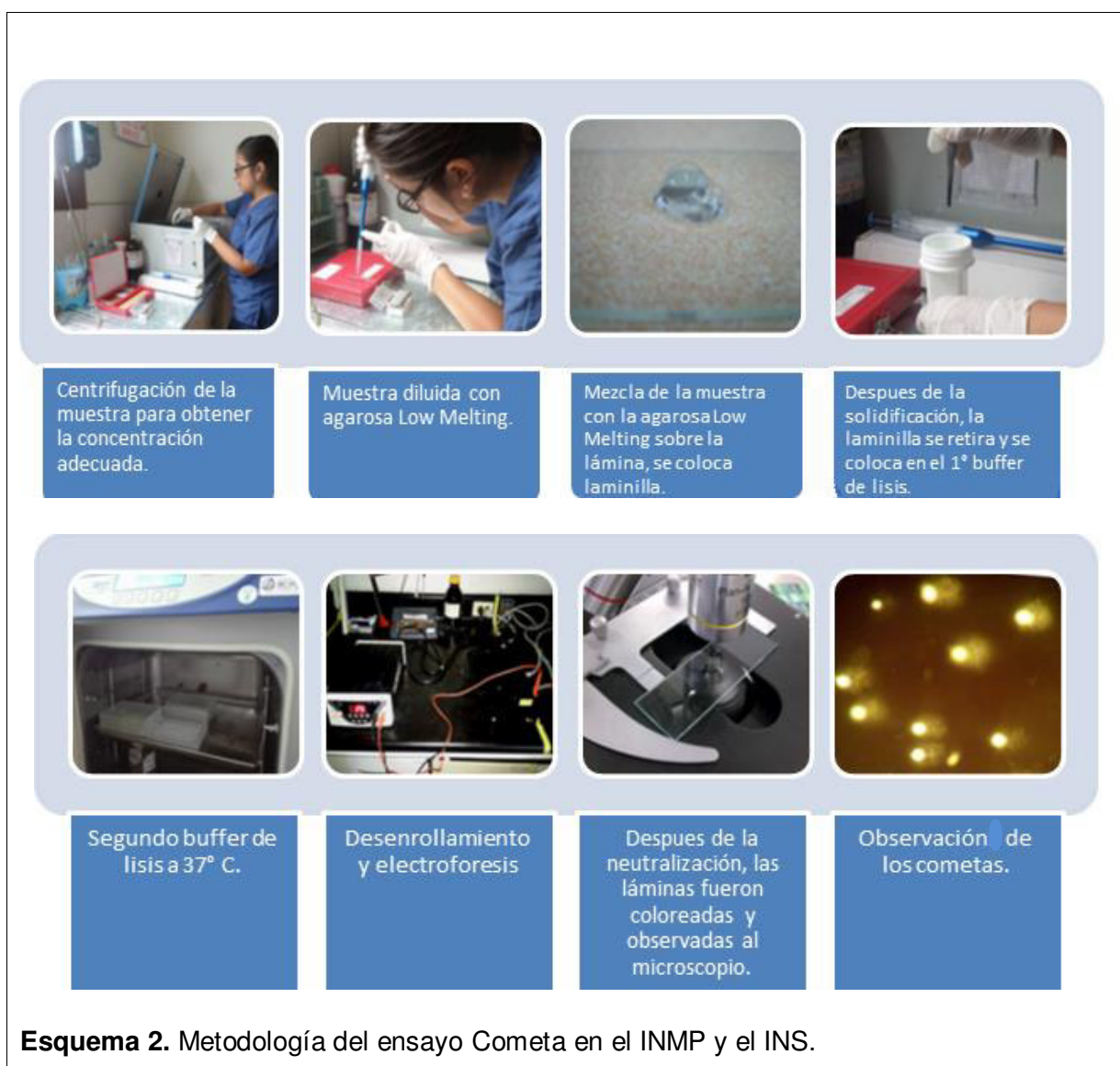
Método destinado a determinar el daño del ADN espermático (Tabla 20).
Modificaciones al método de Haines et al (1998):

a) Preparación de la muestra:

Se suspendió 100 µl de la muestra de semen en 900 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y fue centrifugado a 37°C por 5 min a 1200 rpm. Luego se realizó la dilución para obtener una concentración de 1×10^6 células / ml (Esquema 2).

b) Preparación del Microgel dos capas (Liao *et al.* 2009):

Se mezcló 10 µl de la suspensión de espermatozoides con 75 µl agarosa de bajo punto de fusión al 0.7% (a una temperatura de 37°C) (Tice & Vásquez 1999, Vergara 2010). En caso de oligozoospermia se mezcló 20 µl de la suspensión celular con 65 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.7% (a una temperatura de 37°C), según sea el caso. La mezcla se extendió uniformemente con una laminilla cubreobjetos sobre una lámina portaobjetos que previamente estaba tratada con una capa de agarosa regular al 0.5% (las láminas preliminarmente tratadas se secaron en un horno a 50°C durante la noche). Se retiró suavemente la laminilla luego de que la mezcla solidificara a una temperatura de 4°C (durante 8 min) (Ritter & Knebel 2009). Luego, las láminas fueron sumergidas secuencialmente en dos soluciones de lisis.



c) Buffer de lisis para la liberación del ADN:

Las láminas fueron sumergidas en la solución de lisis 1 (2.5M NaCl, 100mM Na₂ EDTA, 10mM Tris; pH 10,0) que contiene 1% de Triton X-100 y 10% de DMSO durante una hora como mínimo a temperatura de 4° C o en un *cooler* con gel pack refrigerado respetando la cadena de frío para su traslado.

Después de este período inicial de lisis, las láminas fueron sumergidas en la solución de lisis 2 (Dithiothreitol 10 mM y Proteinasa K a una concentración de 100 µg/ml), y se mantuvo a temperatura de 37°C durante 40 minutos. Después de la lisis todas las láminas se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de sal y detergente de los geles que podrían afectar la migración del ADN (Mudry & Carballo 2006).

d) Tratamiento para el relajamiento del ADN y evidencia de rupturas:

Las láminas fueron sumergidas en el tanque de electroforesis horizontal (Figura 9) con una solución de 300 mM NaOH y 1 mM Na₂ EDTA HCl con un pH \geq 13 (Singh *et al.* 1998) se dejó desenrollar en el tanque de electroforesis a 4° C durante 15 minutos. Luego se corrió la electroforesis alcalina (rupturas de simple y doble cadena de ADN) a 25 V, 300 mA durante 10 minutos. Se estableció una orientación de las preparaciones teniendo en cuenta que el ADN, tiene carga negativa migrará hacia el polo positivo.

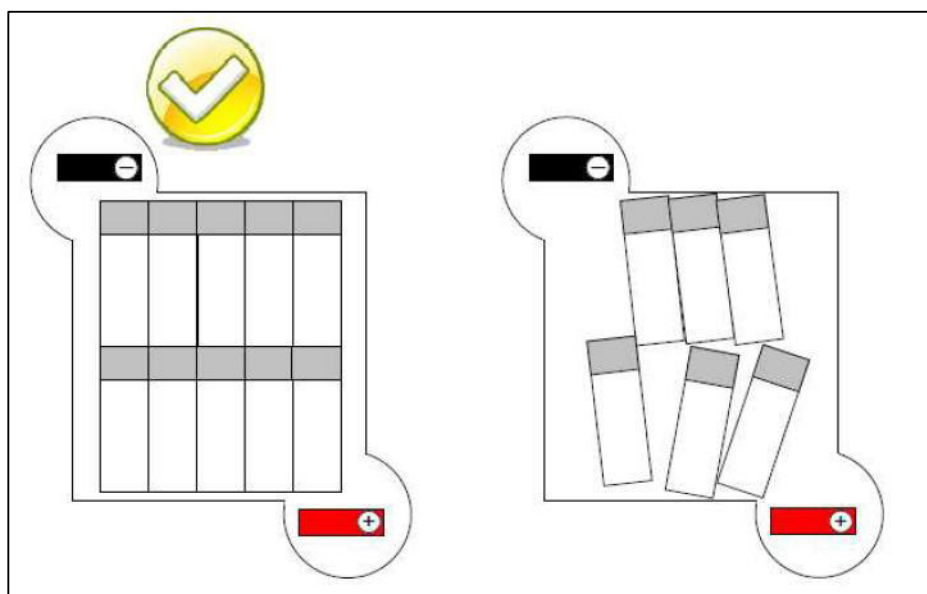


Figura 9. Forma correcta de colocar las láminas en el tanque de electroforesis. Fuente: *The European Network on the Health and Environmental Impact of Nano materials. Comet Assay.*

e) Neutralización:

Después de la electroforesis, las láminas se enjuagaron con 0.4 M Tris (pH 7,0-7,5) por 8-10 minutos a temperatura ambiente con el fin de neutralizar cualquier exceso de álcali sobrante de la electroforesis. Además, permite que el ADN en el “*nucleoide*” se renaturalice, ya que el ADN se encuentra intacto, mientras que el ADN de la cola permanece monocatenario (Zuñiga 2009, Liao *et al.* 2009).

f) Tinción de láminas:

El ADN se tiñó con SYBR Gold colorante fluorescente, a una dilución de 1: 10.000. Las células individuales o "cometas" fueron vistos usando un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro azul ($\lambda = 500 \text{ nm}$), Mca Meiji Techno MT600 usando el objetivo de 40X. En caso de que las láminas no se leyeran el mismo día, se deshidrataron, colocando 2 ml etanol durante 3 minutos y se guardaron en cajas oscuras para evitar un daño accidental a las células fijadas.

g) Conteo de cometas:

Se realizó el análisis de los "cometas" utilizando una cámara adjunta al microscopio de fluorescencia y vinculado a la imagen del programa Comet assay V (Mca. Perceptive Instruments Ltda), se contaron como mínimo de 50 – 100 cometas (Figura 10) (Tice, 2000), según sea el caso (oligozoospermia o normozoospermia). Se anotó el **porcentaje de ADN en la cola del cometa**, llamado también **porcentaje de intensidad (PI)**, término en inglés "*Tail Intensity*" (**TI**) (Romero 2012) (que mide la migración del ADN), el **momento de la cola (MC)** del cometa, término en inglés "*Tail Moment*" (**TM**) (este parámetro tiene en cuenta tanto la distancia de migración del ADN y la cantidad de ADN en la cola del cometa) (Machado *et al.* 2009) y la **longitud de la cola (LC)** del cometa, término en inglés "*Tail Length*" (**TL**) (Distancia de migración de ADN del origen μm). Toda la información fue almacenada en Excel para el posterior análisis estadístico (Figura 11).

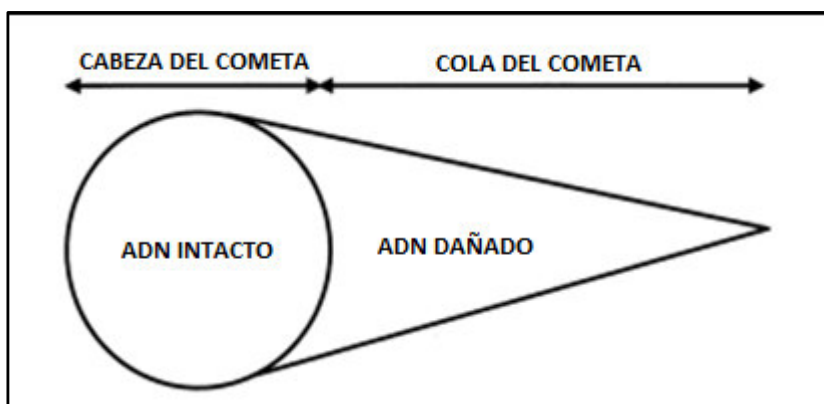


Figura 10. Diagrama típico de los componentes de un cometa. (Steele *et al.* 1999)

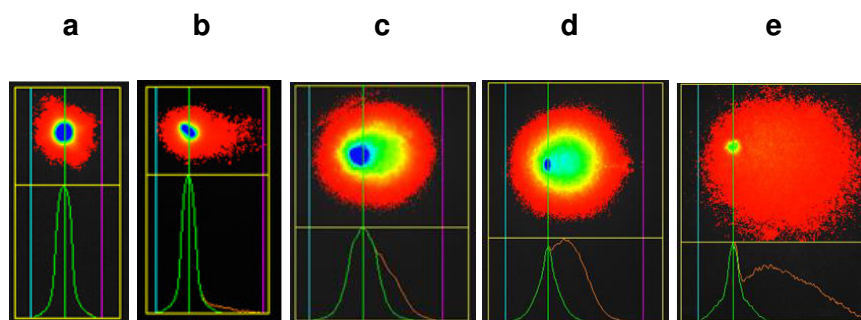


Figura 11. Imágenes del *Comet Assay IV*. **a)** TL 14.36/ TI 0.18/ TM 0.02 **b)** TL 27.69/ TI 7.30/ TM 1.03 **c)** TL 43.59/ TI 24.70/ TM 4.46 **d)** TL 51.28/ TI 58.59/ TM 10.28 **e)** TL 49.74/ TI 64.39/ TM 10.89 (TL=*Tail Length*, TI=*Tail Intensity* y TM=*Tail Moment*).

h) Peróxido de Hidrógeno, validación del ensayo:

Si bien es cierto, el ensayo cometa es muy utilizado en investigación, una limitante es la variabilidad en diversos laboratorios y su sensibilidad a cambios en la metodología (Grandjean *et al.* 1994, Hwang & Bowen 2007). Por ello, para inducir daño de cadena del ADN de los espermatozoides, se utilizó H_2O_2 (Aitken *et al.* 1998, Hughes *et al.* 1996, Altakroni 2014) como control positivo. Las muestras de espermatozoides, diluidas a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml en PBS 1 X (Sigma-Aldrich sin Mg^{++} y Ca^{++}) se incubaron en H_2O_2 (Sigma-Aldrich) a 50 y 500 μM durante 30 minutos a una temperatura entre $2^\circ C$ y $5^\circ C$, luego el nivel de daño inducido al ADN fue detectado por el ensayo Cometa alcalino. Como control negativo, dos de los participantes adicionales con fertilidad probada dejaron muestra en cuatro oportunidades a lo largo de la investigación las cuales fueron evaluadas también con H_2O_2 contrastándose al azar con los pacientes del estudio.

4.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el paquete estadístico STATA 15, donde se hizo un análisis de descriptivos de todas las variables (como los percentiles 25 – 75, la mediana, media, rango, desviación estándar; para cada grupo y subgrupo). Los datos fueron expresados:

$$\frac{\bar{x} \pm DE}{\tilde{x}}$$

Dónde:

\bar{x} : *Media aritmética.*

\tilde{x} : *Mediana, p50.*

DE : *Desviación estándar.*

En un intervalo de confianza del 95% (IC del 95%). Para encontrar el posible efecto de la exposición, factores ambientales y ocupacionales, los pacientes se dividieron en grupos expuestos y no expuestos para la mayoría de los casos. Se usó la prueba de normalidad (*Kolmogorov-Smirnov*). Las comparaciones entre grupos fueron realizadas utilizando el test de *Kruskal-Wallis*. La significación estadística se estableció en 0.05, es decir, los valores de **p < 0,05** fueron considerados estadísticamente significativos. El test de *Mann-Whitney* (test para valores no paramétricos) fue usado para identificar diferencias significativas entre los grupos. El coeficiente de correlación de *Pearson* fue usado para medir la asociación entre las variables. Los parámetros estudiados fueron la edad, hábitos, parámetros seminales como, la concentración, movilidad progresiva, vitalidad y morfología espermática; además se analizó la fragmentación de ADN en el total de espermatozoides, con los tres valores del Comet Assay V.

V. RESULTADOS

Pruebas de Normalidad

Previo al análisis comparativo entre los grupos de estudio, se aplicó la prueba de normalidad, para determinar si las variables dependientes se ajustan o desvían de la distribución normal.

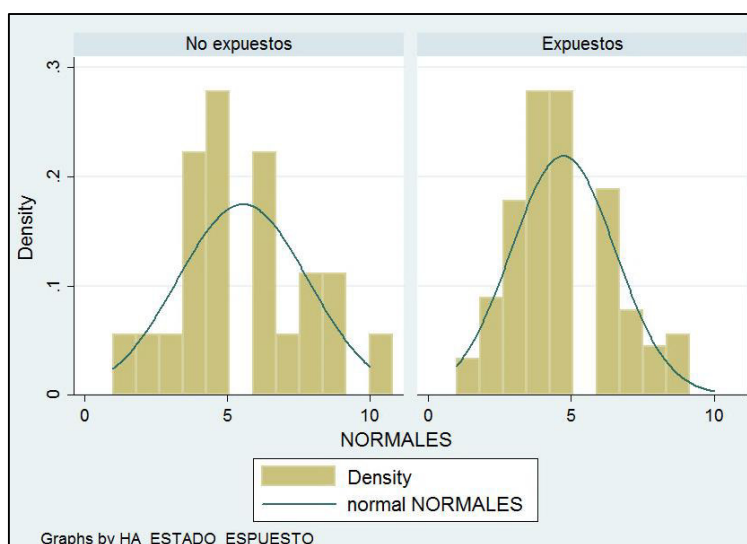


Figura 12. Resumen de la distribución normal para la variable porcentaje de formas Normales ($p=0.95837$, $p=0.76724$).

Se observó que el porcentaje de progresivos, porcentaje de vitalidad, concentración, el porcentaje de intensidad, de momento, y de longitud se desviaron significativamente de la distribución normal ($p < 0.05$) a excepción de la morfología, en el porcentaje de espermatozoides normales en pacientes expuesto y no expuestos (Figura. 12).

Los resultados fueron desarrollados de acuerdo con los objetivos, se incluyen análisis descriptivos y analíticos de la siguiente manera:

1) DESCRIPCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO.

De los 137 individuos que fueron analizados para el espermatograma, los días recomendados de abstinencia fueron de 3-7 días, sin embargo, solo 130 cumplieron con lo establecido, lo que corresponde al 94.96 % de las muestras analizadas. Los 7 pacientes que no cumplieron con los días de abstinencia corresponden al 5.04 % de las muestras analizadas, de los cuales 5 pertenecieron al grupo de exclusión y no están en el análisis. El día 5 de abstinencia tuvo la mayor frecuencia con el 33.81 % de las muestras analizadas.

Los que cumplieron los días de abstinencia (n=130) y los que no cumplieron (n=7), no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en relación con los parámetros seminales analizados como concentración, porcentaje de progresivos, porcentaje de vitalidad y parámetros del daño a nivel de ADN. Todos los individuos llenaron el pre-cuestionario y cuestionario, lo que permitió, las siguientes agrupaciones:

Tabla 6. Grupos etarios y parámetros seminales Vs. Información de los pacientes. (N=Normozoospermia; P.S.A=Parámetros Seminales Alterados).

Información	G1 = 20-30 años (n = 40)		G2 = 31-40 años (n = 60)		G3 = 41-55 años (n = 27)	
	N (n=29)*	P.S.A (n=11)	N (n=25)	P.S.A (n=35)	N (n=4)	P.S.A (n=23)
Edad promedio ($\bar{X} \pm DE$)	25.69 \pm 2.35	26.27 \pm 2.97	35.12 \pm 2.30	36.17 \pm 2.50	44 \pm 1.15	44.57 \pm 2.87
Días de abstinencia (p50)	5	4	5	4	5	5
Años que intentan tener hijos ($\bar{X} \pm DE$)	2.5 \pm 1.73	1.84 \pm 0.98	3.09 \pm 1.97	4.09 \pm 2.63	4.5 \pm 1.29	4.39 \pm 3.50
Número de pacientes con hijos	8(27.59%)**	1 (9.09%)	6 (24%)	2 (5.71%)	1 (25%)	6 (26.09%)
Porcentaje de intensidad ($\bar{X} \pm DE$)	13.72 \pm 16.82	33.74 \pm 21.19	26.73 \pm 21.98	30.85 \pm 18.02	35.56 \pm 20.69	33.05 \pm 20.95
Número de pacientes con abortos	1 (3.44%)	4 (36.36%)	7 (28%)	5 (14.29%)	1 (25%)	9 (39.13%)

\bar{X} : Media, DE: Desviación estándar, p50: Mediana. (*) Dentro del grupo, están los considerados como pacientes controles (**) Grupo control, pertenecen al grupo de participantes adicionales.

Ocho pacientes del grupo de normozoospermia del G1 que corresponden al 27.59% del grupo, tienen hijos y el porcentaje de intensidad fue de 13.06 ± 14.96 (Tabla 9). En el grupo G1 de normozoospermia solo un paciente refirió haber tenido un aborto con su pareja y el porcentaje de intensidad fue de 13.72 ± 16.82 (Tabla 6). Se observa que los pacientes que presentan algún parámetro seminal alterado mantienen el porcentaje de intensidad semejante independiente de la edad, a diferencia del grupo de normozoospermia, que aumenta con la edad. Otra observación importante, la encontramos en la siguiente figura, de los pacientes que mencionaron tener abortos, se encontró una relación directa entre el número de abortos y el porcentaje de intensidad (Figura 13).

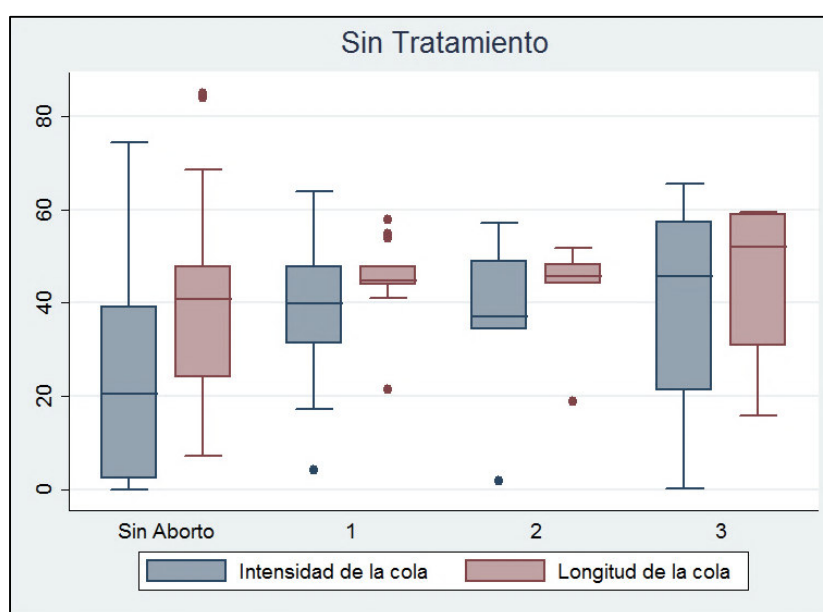


Figura 13. El porcentaje de intensidad de ADN en la cola ($p = 0.003$) y la longitud de la cola ($p = 0.014$) Vs. Abortos presentan diferencias significativas.

Se analizaron también las respuestas de los pacientes en relación al estilo de vida (Tabla 7). Los pacientes que mencionaron que consumen bebidas alcohólicas, no mostraron diferencia significativa con aquellos que no consumen con respecto al porcentaje de intensidad ($p = 0.088$) o sus parámetros seminales, de igual forma aquellos que consumieron en el pasado drogas ($p = 0.209$), o si tienen alguna dieta ($p = 0.476$), o tuvieron alguna enfermedad ($p = 0.271$), o consumen algún medicamento ($p = 0.180$),

suplemento vitamínico ($p = 0.011$) e incluso aquellas personas que no se consideran saludables ($p = 0.166$).

Tabla 7. Número de pacientes que respondieron **SI/NO**.

Preguntas	G1 = 20-30 años (n = 40)		G2 = 31-40 años (n = 60)		G3 = 41-55 años (n = 27)	
	N (n=29)	P.S.A (n=11)	N (n=25)	P.S.A (n=35)	N (n=4)	P.S.A (n=23)
Fuma (Sí/No)	5/24	3/8	9/16	11/24	0/4	5/18
Bebidas alcohólicas (Sí/No)	28/1	10/1	17/8	14/21	3/1	13/10
Drogas (Sí/No)	2/27	1/10	1/24	2/33	0/4	0/23
Dieta (Sí/No)	1/28	0/11	0/25	1/34	0/4	0/23
Enfermo hace poco (Sí/No)	0/29	2/9	2/23	5/30	0/4	6/17
Medicamentos (Sí/No)	0/29	3/8	3/22	5/30	1/3	4/19
Suplementos Vitamínicos (Sí/No)	0/29	2/9	1/24	5/30	1/3	5/18
No se considera una persona saludable (Sí/No)	1/28	2/9	2/23	1/34	1/3	2/21

N: Normozoospermia, P.S.A: Parámetros seminales alterados.

El único parámetro de estilo de vida que mostro diferencia significativa con respecto a los parámetros del daño a nivel de ADN fue el consumo ocasional de tabaco (Figura 14).

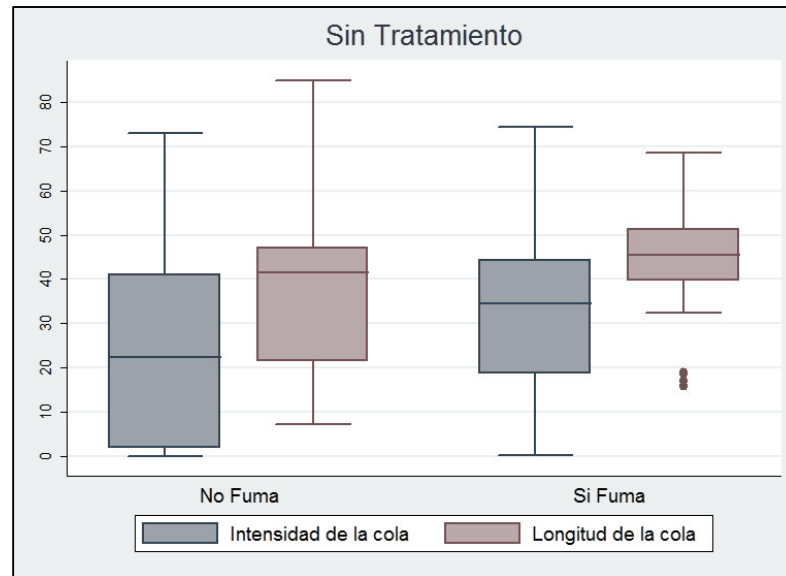


Figura 14. El porcentaje de intensidad de los que fuman ocasionalmente y los que no presentan diferencia significativa ($p = 0.024$) a diferencia del momento y longitud de la cola, que no muestran diferencia significativa ($p = 0.151$).

Las horas de trabajo se agruparon en tres, y se comparó con el porcentaje de intensidad ($p = 0.504$), también se agruparon los años trabajando (Figura 15), de los cuales el grupo que tenía más años trabajando presentaba un daño mayor ($p = 0.010$).

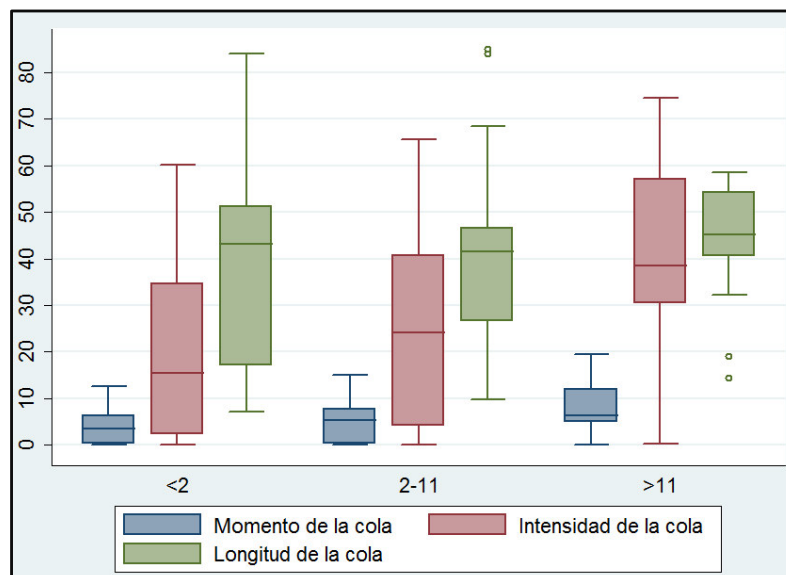


Figura 15. La intensidad de cola es significativamente mayor en el grupo que trabaja más de 11 años.

2) DETERMINACION DE LA EXPOSICION A LOS FACTORES DE RIESGO OCUPACIONAL (de acuerdo con el cuestionario) ASOCIADAS AL ESPERMATOGRAMA Y ENSAYO COMETA.

El desarrollo del cuestionario permitió determinar si los pacientes se encontraban expuestos (ya sea por inhalación o contacto directo) a metales pesados, pesticidas, herbicidas, disolventes inorgánicos, exceso de vapores, combustión - humo, hidrocarburos, incluso si se encontraban expuestos a riesgos físicos como sedentarismo, radiaciones, calor, vibraciones mecánicas (Tabla 8) o no. Se tomó en cuenta el tiempo de exposición durante el día. Además, los pacientes mencionaron en la mayoría de los casos, que no existía ningún tipo de control a estos riesgos (Tabla 12).

Tabla 8. Exposición a factores de riesgo ocupacional analizados Vs. el porcentaje de progresivos, porcentaje de vitalidad, concentración y el porcentaje de Intensidad.

Exposición	N°	% Progresivos ($\bar{X} \pm DE$)	% Vitalidad ($\bar{X} \pm DE$)	Concentración ($\bar{X} \pm DE$)	% Intensidad ($\bar{X} \pm DE$)
Ambientes térmicos	39	52.74 \pm 16.27	73.74 \pm 8.57	55.61 \pm 45.63	36.55 \pm 20.47
Vibraciones mecánicas	28	55.82 \pm 17.63	76.29 \pm 7.46	54.86 \pm 36.57	39.60 \pm 19.65
Sedentarismo	66	52.89 \pm 16.04	74.42 \pm 12.18	48.80 \pm 35.78	29.41 \pm 20.49
Metales pesados	47	55.02 \pm 15.06	75.62 \pm 8.69	54.78 \pm 37.15	26.67 \pm 21.32
Pesticidas, herbicidas	5	56 \pm 18.53	76.8 \pm 8.11	51.99 \pm 35.50	40.61 \pm 16.61
Pinturas, Barnices	22	53.09 \pm 16.33	73.86 \pm 10.60	56.96 \pm 40.78	35.62 \pm 23.36
Hidrocarburos	11	53.36 \pm 17.59	74 \pm 5.67	64.13 \pm 33.01	43.85 \pm 22.07
Radicaciones, Rayos X	5	56 \pm 18.53	76.8 \pm 8.11	51.99 \pm 35.50	40.61 \pm 16.61
Campos electromagnéticos (V/m)	5	48.6 \pm 22.57	63.6 \pm 18.28	24.83 \pm 26.06	49.88 \pm 6.59

X: Media, DE: Desviación estándar, V/m: Voltios por metros.

De los pacientes que marcaron **SÍ** para cada factor de riesgo analizándolos de forma independiente no difieren de los que dijeron **NO** con respecto a los porcentajes de progresivos, vitalidad, de espermatozoides normales; y concentración (Figura 16.1 y 16.2), a excepción del porcentaje de Intensidad, que es el parámetro principal del ensayo Cometa (Collins 2002) y a pesar de tener un efecto cruzado por la suma de cada factor de riesgo (por esa razón no hay valores de p-valor) se observan variaciones (rectángulo rojo grande). En el caso de campos electromagnéticos, el parámetro de la concentración de los espermatozoides (Figura 16.1) difiere con respecto al grupo control (a más pacientes expuestos menor será la concentración $r=-0.15$) sin embargo, no hay diferencia significativa ($p = 0.0665$), las medianas muestran similitud (rectángulo rojo pequeño). Para el grupo de pacientes con respecto al grupo de participantes adicionales: control (Tabla 9) muestran diferencia significativa ($p=0.0380$) para el porcentaje de Intensidad, parámetros secundarios y morfología (Tabla 10).

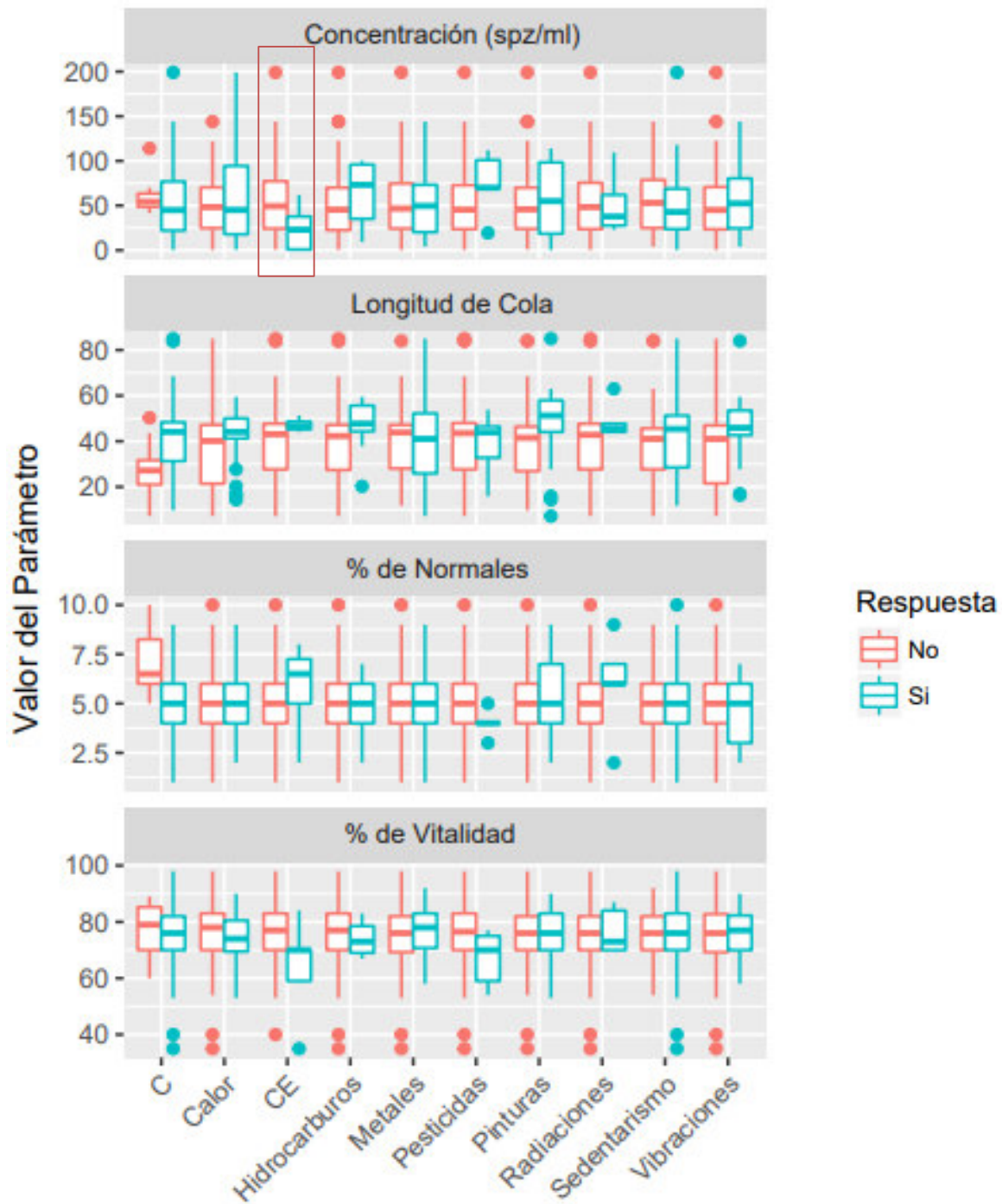


Figura 16.1. Valores del Parámetro Vs. los grupos: C=control, exposición a calor, CE= Campos electromagnéticos, hidrocarburos, metales pesados, pesticidas, pinturas, radiaciones, sedentarismo y vibraciones. En el caso de los participantes control (n=8) son jóvenes que se encuentran dentro del grupo G1 de edad, tienen hijos y los parámetros seminales mostraron normozoospermia: pertenecen al grupo de participantes adicionales.

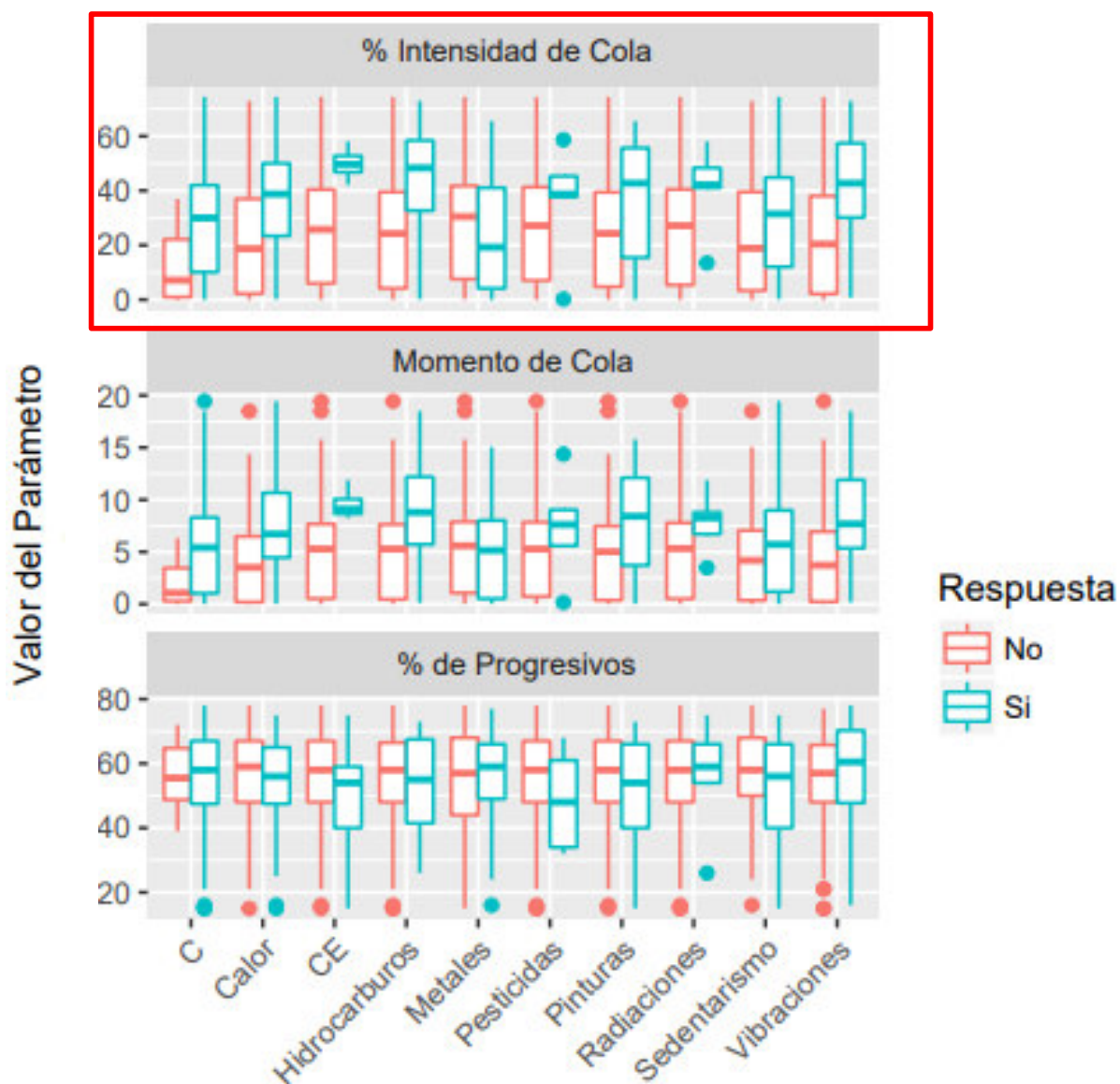


Figura 16.2. Valores del Parámetro Vs. los grupos: C=control, exposición a calor, CE= Campos electromagnéticos, hidrocarburos, metales pesados, pesticidas, pinturas, radiaciones, sedentarismo y vibraciones. En el caso de los participantes control (n=8) son jóvenes que se encuentran dentro del grupo G1 de edad, tienen hijos y los parámetros seminales mostraron normozoospermia: pertenecen al grupo de participantes adicionales.

Tabla 9. Pacientes y controles (varones con hijos, normozoospermia y jóvenes) Vs. Los porcentajes de progresivos y vitalidad; concentración y el porcentaje de Intensidad.

Grupo	N°	% Progresivos	% Vitalidad	Concentración	% de Intensidad
Controles ($\bar{X} \pm DE$) Mediana	8	56.5 \pm 11.60 55.5	77.5 \pm 10.43 79	61.54 \pm 22.95 54.4	13.06 \pm 14.96 7.13
Pacientes ($\bar{X} \pm DE$) Mediana	119	54.59 \pm 15.73 58	74.76 \pm 10.57 76	51.99 \pm 37.74 45	27.90 \pm 20.64 30.00
p-valor		0.9684	0.4715	0.2476	0.0380*

p-valor: nivel de significancia, ***p-valor** estadísticamente significativo (*Kruskal-Wallis*).

Tabla 10. Parámetros secundarios del ensayo cometa: momento de la cola y longitud de la cola; y morfología comparando el grupo control con el grupo de pacientes, se observa diferencia significativa para los grupos.

	Momento de la cola	Longitud de la cola	Morfología
Controles ($\bar{X} \pm DE$)	2.16 \pm 2.54	27.37 \pm 14.38	7.13 \pm 1.73
Mediana	1.07	27.18	6.5
Pacientes ($\bar{X} \pm DE$)	5.55 \pm 4.61	40.44 \pm 15.87	4.77 \pm 1.86
Mediana	5.41	44.10	5
p-valor	0.0462*	0.0266*	0.0014*

***p-valor** estadísticamente significativo (*Kruskal-Wallis*).

Adicionalmente, todos los pacientes que mencionaron estar expuestos a algún factor de riesgo ocupacional fueron agrupados y comparados con los no expuestos determinando la frecuencia del uso de equipos de protección personal (Tabla 11) y las diferencias a nivel de daño en el ADN (Tabla 12).

El daño genotóxico de los pacientes expuestos a algún factor de riesgo ocupacional y de los no expuestos, se muestra en el anexo nº 3 (Tabla 22), encontrando que el momento de la cola, el porcentaje de intensidad y la longitud de la cola difieren en los grupos (Figura 17).

Tabla 11. Características los pacientes EXPUESTOS y NO EXPUESTOS a riesgos químicos o físicos

Características	Descriptivos	Expuestos (n=106)	No expuestos (n=21)
Edad	Media DE p50	34.98 6.97 36	31.95 8.07 29
Tiempo de trabajo (años)	Media DE p50	7.62 6.04 6.5	6.34 5.12 5
Frecuencia de exposición (horas/día)	Media DE p50	9.21 2.82 9.5	7.52 2.11 8
Equipo de protección personal	SÍ NO	54 (42.52%) 52 (40.94%)	0 (0%) 21 (16.54%)

DE: Desviación estándar, **p50:** Mediana.

Tabla 12. Pacientes que usan equipos de protección personal y los parámetros del daño en el ADN del espermatozoide.

	No expuestos, sin EPP.	Expuestos, sin EPP.	p-valor	Expuestos, con EPP.
Momento de la cola ($\bar{X} \pm DE$) Mediana	3.16 ± 3.48 1.83	6.11 ± 4.83 5.69	0.0146*	5.28 ± 4.48 5.41
Porcentaje de intensidad ($\bar{X} \pm DE$) Mediana	17.30 ± 16.78 12.99	29.61 ± 20.86 30.49	0.0394*	27.35 ± 20.89 30.41
Longitud de la cola ($\bar{X} \pm DE$) Mediana	32.17 ± 13.02 28.72	43.47 ± 16.58 45.64	0.0055*	38.29 ± 15.90 41.28

***p-valor** estadísticamente significativo.

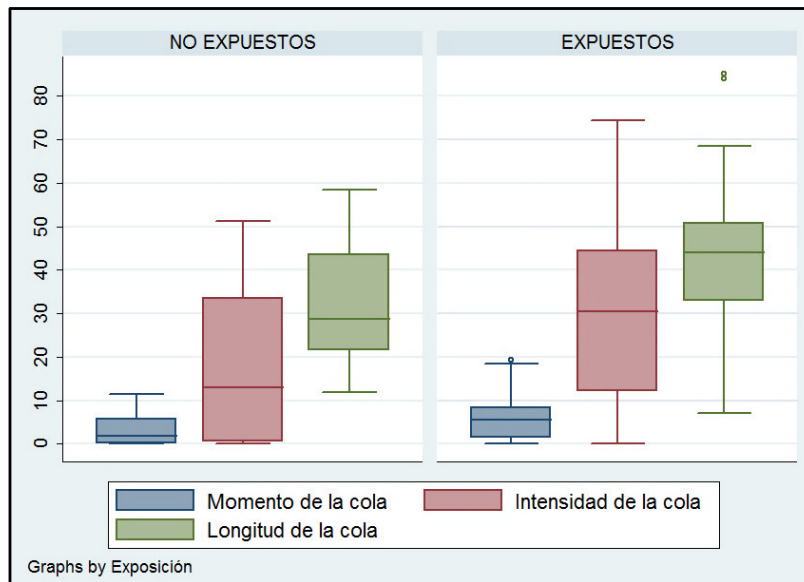


Figura 17. No Expuestos Vs Expuestos ($p < 0,05$).

3) VERIFICACIÓN DE ENSAYO COMETA PARA ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

El protocolo fue probado a diferentes condiciones experimentales (corrida electroforética, Proteinasa K y Ditiotreitól concentración). Estas diferentes condiciones se eligieron de acuerdo a la revisión de la bibliografía, la cual era variable (Hughes *et al.* 1997; Enciso 2009; Zúñiga 2009; Vergara 2010; Altakroni 2014). Estos estudios utilizaron diferentes concentraciones de Proteinasa K en tampón de lisis (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 1 mg / ml). Sin embargo, la concentración más empleada por los autores consultados fue de 50-100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de Proteinasa K en tampón de lisis y $\text{pH} \geq 13$ para tampón de electroforesis. Otro punto importante es la incubación de las láminas, que en algunos estudios dejaban durante la noche en tampón de lisis a 37 ° C, sin embargo, no resultó para este procedimiento ya que la agarosa de las láminas se disolvía, pero se incubó por un periodo de 40 min a 1 hora a 37° C ya que la actividad de la Proteinasa K es más alto a esta temperatura. Por lo tanto, se examinaron las siguientes condiciones: la concentración de Proteinasa K (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) en el tampón de lisis, la utilización de DTT en tampón de lisis, solo o en combinación con Proteinasa K (Tabla 21) y los diferentes tiempos de incubación en tampón de lisis (24 horas, 40 minutos y 20 minutos). Dos participantes del grupo de adicionales fueron tomados como controles para examinar el

efecto de la concentración de Proteinasa K en tampón de lisis en el porcentaje de intensidad. En la figura 18 se observa algunas pruebas del ensayo realizado.

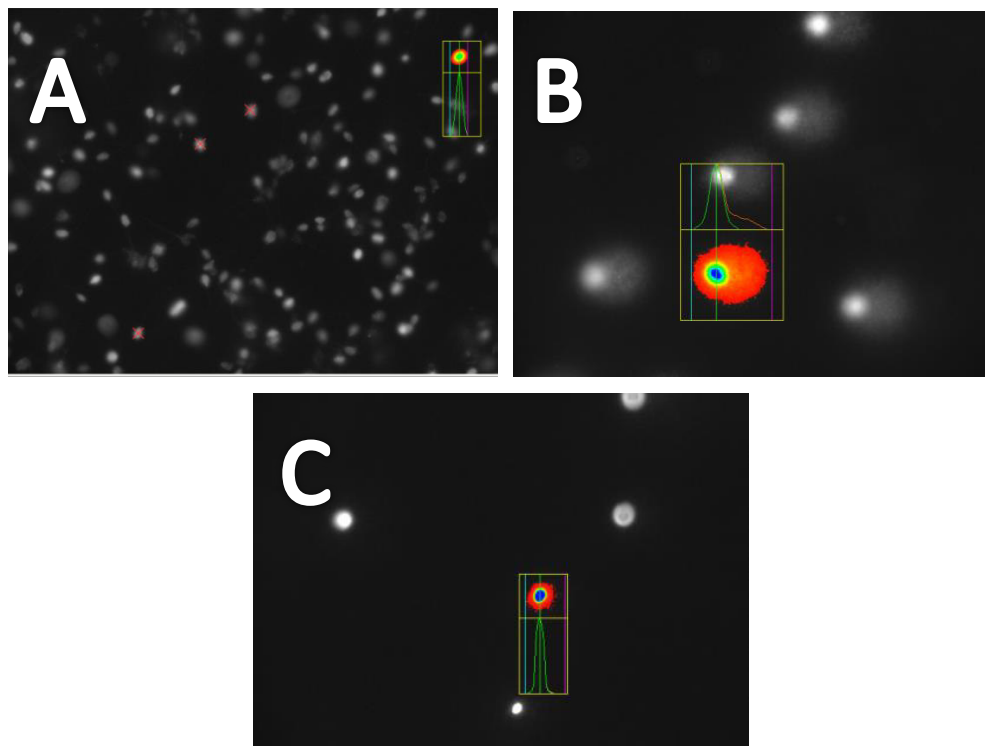


Figura 18. La imagen A corresponde al tratamiento solo de Proteínasa K, sin DTT. Además, las primeras pruebas la dilución fue inexacta. B y C muestran el mismo tratamiento, pero en diferente paciente. Tiempo de incubación en Proteinasa K + DTT es de 40 minutos a 37° C.

Dos participantes adicionales, fueron sometidos al ensayo Cometa, con muestra fresca y total, se midió el porcentaje de intensidad en cuatro oportunidades a lo largo del proyecto (Figura 19 y 20), adicionalmente se evaluó el daño en la muestra con Peróxido de Hidrógeno, la cual fue incubada por 30 minutos a temperatura de 4° C, a dos concentraciones 50 y 500 μ M (Figura 19.B).

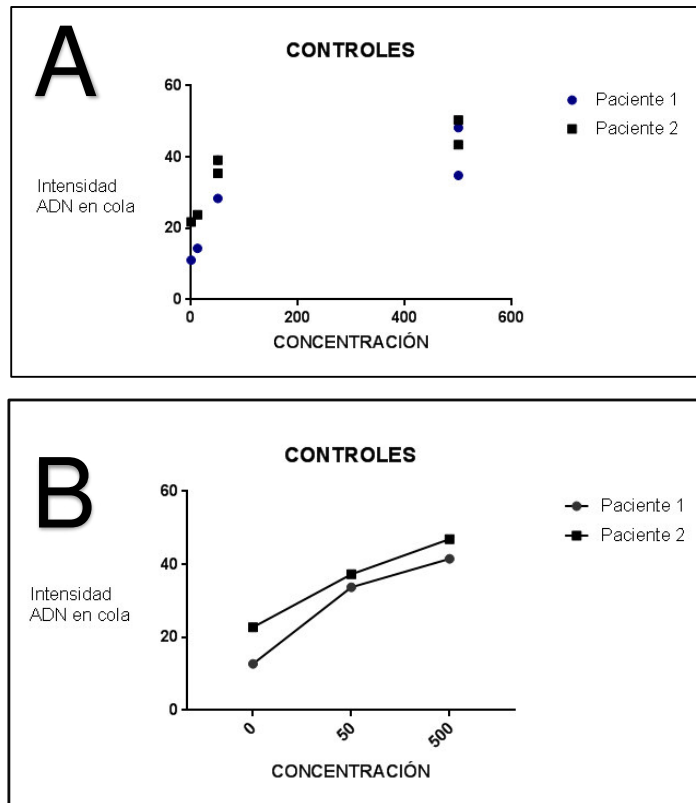


Figura 19. En la figura A se observa los puntos como pruebas independientes en los tratamientos realizados a diferencia de la figura B que muestra el promedio de los tratamientos según el paciente.

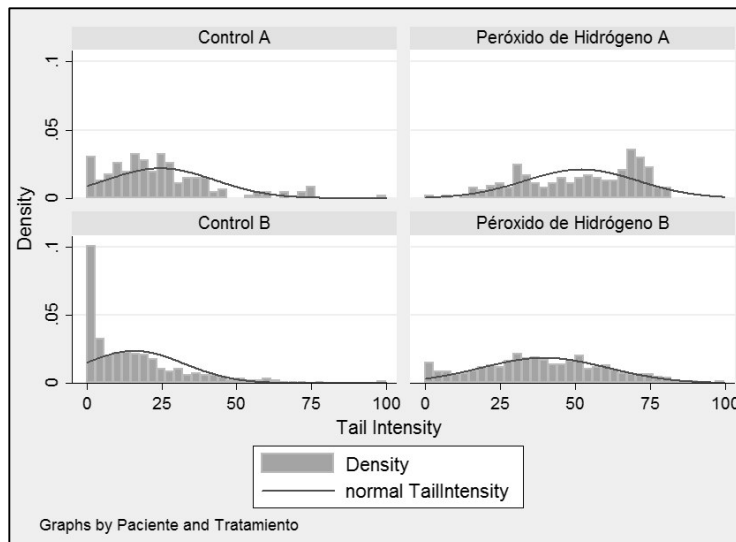


Figura 20. Densidad del porcentaje de intensidad del participante 1 (control B) y 2 (control A) en condiciones normales y muestra tratada con Peróxido de Hidrógeno. Se aprecia que las muestras sin tratamiento tienen una campana a la izquierda.

Además, parte de la muestra fresca y total de 26 pacientes al azar, fue separada para el tratamiento con Peróxido de Hidrógeno (500 μ M) durante 30 minutos a una temperatura de 4° C (Figura 21 y 22). Y se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) a nivel de daño en el ADN espermático entre los grupos: Sin tratamiento y con Peróxido de Hidrógeno (Tabla 13).

El momento de la cola y el porcentaje de intensidad (Figura 21), presentan una correlación positiva que es potencial y exponencial.

Tabla 13. Estadísticos descriptivos para los grupos sin tratamiento y Peróxido de Hidrógeno.

			MEDIA	DE	MEDIANA	P25	P75
Pacientes	Sin Tratamiento	Momento de la cola	5.55264	4.611385	5.409839	0.979845	8.335925
		Porcentaje de intensidad	27.8954	20.64191	30.00336	9.379938	42.03164
		Longitud de la cola	40.43811	15.86544	44.10256	30.76923	48.46173
	Peróxido de Hidrógeno	Momento de la cola	13.82057	14.12472	9.447122	6.380914	16.65986
		Porcentaje de intensidad	42.25482	22.18596	36.95607	26.8762	53.79345
		Longitud de la cola	70.42702	37.67037	52.17949	46.66667	102

DE: Desviación estándar, P25: Percentil 25%, P75: Percentil 75%. Momento de la cola ($p=0.0001$), porcentaje de intensidad ($p=0.0095$) y longitud de la cola ($p=0.0001$).

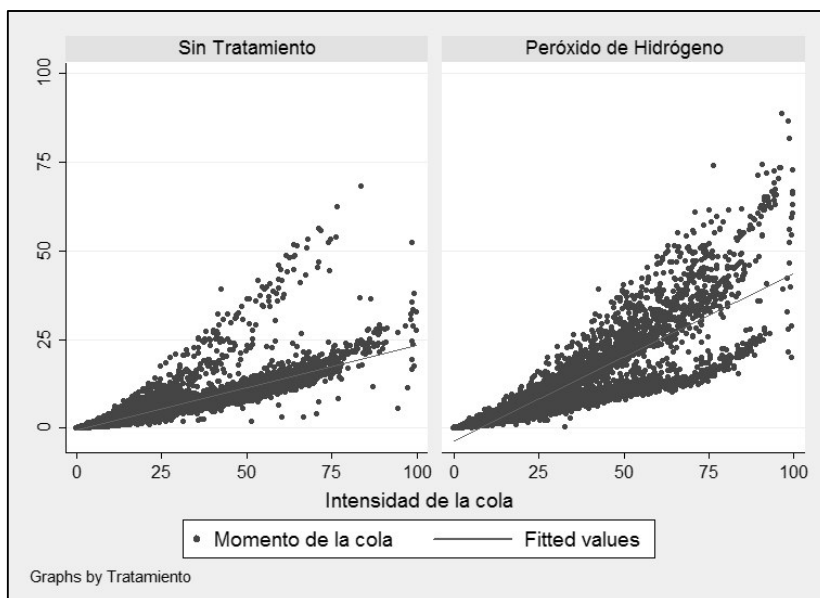


Figura 21. Correlación potencial exponencial positiva de los 26 pacientes al azar.

Observando la densidad del total de las muestras de 26 pacientes al azar, se aprecia que las muestras sin tratamiento tienen una campana a la izquierda, marcando que los resultados no se extienden por encima de cincuenta, además de ser el valor 1 el de mayor densidad. A diferencia de las muestras con Peróxido de Hidrógeno que muestran una densidad en una campana más constante.

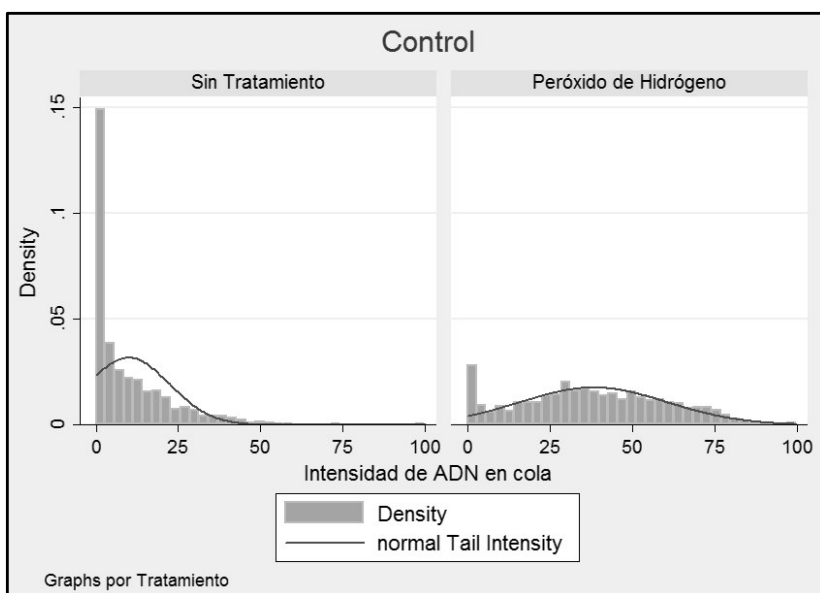


Figura 22. Densidad del porcentaje de intensidad de ADN en la cola de los 26 pacientes al azar.

4) FRECUENCIA DE PACIENTES CON MAYOR DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO SE AGRUPARON SEGÚN OCUPACIÓN (Lepecka-Klusek *et al.* 2011) POR EL AUMENTO DE RIESGO EN APARICIÓN DE PROBLEMAS DE INFERTILIDAD EN:

- **Ocupaciones consideradas alto riesgo (n=21)**

Mecánicos; cocineros; taxistas; agricultores; soldadores; electricistas; electrónicos; operarios (Químicos).

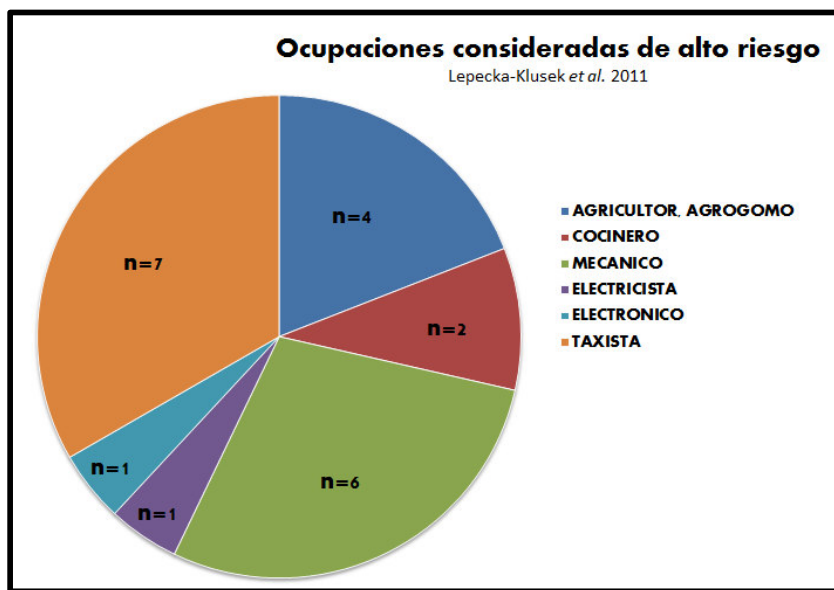


Figura 23. Distribución de las ocupaciones en el grupo de alto riesgo. Lepecka-Klusek *et al.* 2011

- **Ocupaciones consideradas de mediano riesgo (n=39)**

Personales de transporte (taxistas o conductores) y otras actividades consideradas de bajo riesgo; deportistas; personales de oficina (sedentarismo excesivo) y ocupación en el pasado considerada de alto riesgo; albañiles; carpinteros; operarios (maquinarias); comerciantes de productos químicos; especialistas en informática, policías motorizados.

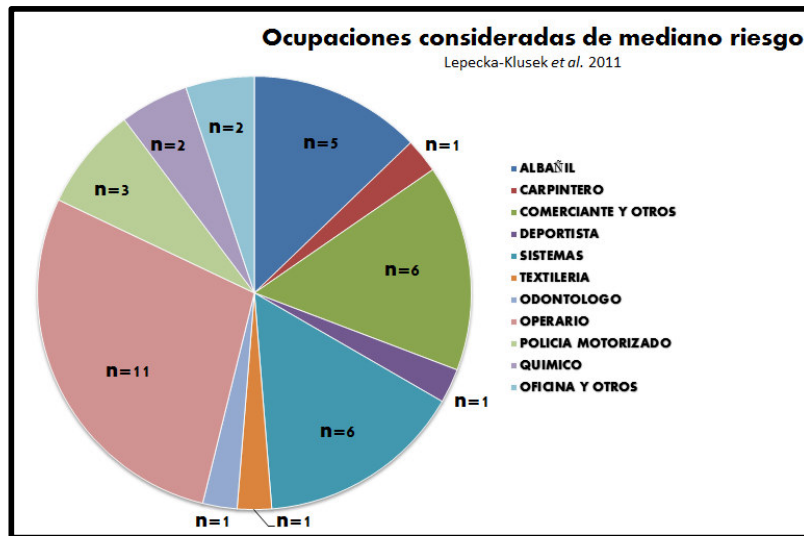


Figura 24. Distribución de las ocupaciones en el grupo de mediano riesgo. Lepecka-Klusek *et al.* 2011

- **Ocupaciones consideradas de bajo riesgo (n=67)**

Estudiantes, personales de oficina (Sedentarismo), laboratoristas, comerciantes, inspectores, estibadores y docentes.

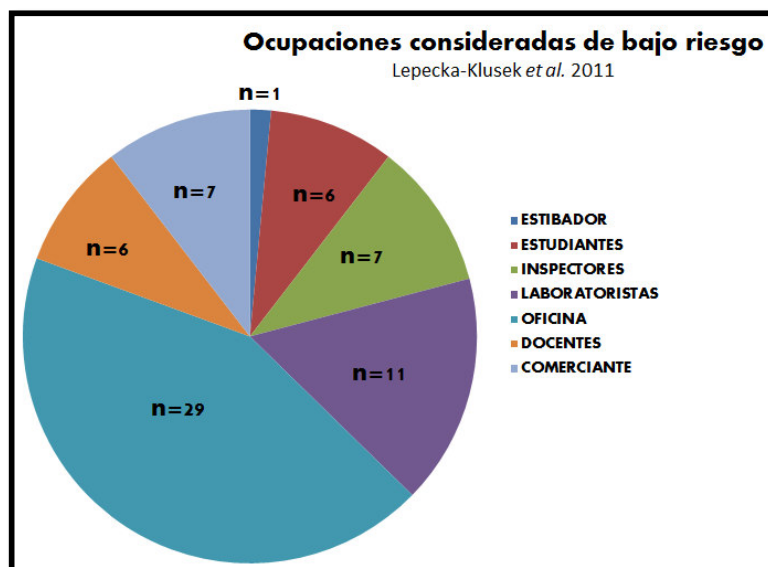


Figura 25. Distribución de las ocupaciones en el grupo de bajo riesgo. Lepecka-Klusek *et al.* 2011

Considerando las ocupaciones mencionadas, se evaluó las agrupaciones según el nivel de exposición con los parámetros seminales (Tabla 14) y el porcentaje de intensidad de ADN en la cola (Tabla 15), en el cual se observa que hay diferencia significativa para este último parámetro.

Tabla 14. Riesgo ocupacional Vs. edad, % Progresivos, % Vitalidad, Concentración y % Normales.

	Bajo Riesgo	Medio Riesgo	Alto Riesgo	p-valor
Edad	32.72 ± 7.91 ^a	36.59 ± 5.36 ^b	36.19 ± 6.68 ^{ab}	0.0151*
% Progresivos	56.12 ± 12.74	53.26 ± 18.77	52.90 ± 16.97	0.9170
% Vitalidad	76.37 ± 9.62	73.38 ± 12.71	73.19 ± 8.52	0.3852
Concentración	54.99 ± 39.48	42.29 ± 31.92	64.05 ± 34.29	0.0492
% Normales	5.24 ± 2.12	4.47 ± 1.27	4.71 ± 2.19	0.0742

$\bar{X} \pm DE$, ***p-valor** estadísticamente significativo (*Kruskal-Wallis*).

Post-hoc: *Mann-Whitney* (a diferente de b).

Tabla 15. Porcentaje de intensidad Vs. riesgo ocupacional.

	Porcentaje de intensidad
Bajo Riesgo	15.55 ± 16.51 ^a
Medio Riesgo	36.60 ± 17.24 ^b
Alto Riesgo	44.72 ± 16.07 ^b
p-valor	0.0001*

$\bar{X} \pm DE$, ***p-valor** estadísticamente significativo (*Kruskal-Wallis*).

Post-hoc: *Mann-Whitney* (a diferente de b).

5) EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO MEDIDO POR EL ENSAYO COMETA ALCALINO Y LOS PARÁMETROS SEMINALES DEL ESPERMATOGRAMA CLÁSICO DE LOS INDIVIDUOS DEL ESTUDIO.

La media del volumen seminal fue de 2.95 ± 1.33 ml (valor mínimo fue 0.5 ml y el valor máximo fue 7.5 ml); la concentración fue de $51.88 \pm 36.42 \times 10^6/\text{ml}$ (rango entre $0.5 \times 10^6 / \text{ml}$ y $199.1 \times 10^6 / \text{ml}$); la movilidad fue de 54.37 ± 15.72 % (rango entre 15 % y 78 %), la vitalidad fue 74.94 ± 10.61 (rango 35 % y 98 %) y la morfología fue de 4.86 ± 1.92 % (rango entre 1 % y 10 %).

De las muestras procesadas en el ensayo Cometa el 45.67 % (58 de 127) de las muestras, no presentaron alteraciones en los parámetros seminales evaluados (normozoospermia). De los pacientes con alteraciones en los parámetros seminales la anomalía predominante fue teratozoospermia. El 44.88 % (57 de 127) de las muestras evaluadas presentaron anomalías en la morfología, las más frecuentes, de la cabeza. El 30.71 % (39 de 127) mostraba alteraciones únicamente en la morfología. El 37.01 % (47 de 127) de las muestras presentaron solo un parámetro seminal alterado, el 11.02 % (14 de 127) presentaron dos parámetros seminales alterados, el 3.15 % (4 de 127) presentaron tres parámetros seminales alterados al igual que los que presentaron cuatro parámetros seminales alterados.

Los resultados con respecto los parámetros seminales entre los grupos no muestran diferencia significativa ($p \geq 0.05$), el único parámetro que muestra una diferencia significativa (Tabla 16) es el valor del porcentaje de las formas normales de los espermatozoides ($p < 0.05$) de los pacientes normozoospermicos y de los pacientes con algún parámetro seminal alterado. A diferencia de los resultados del ensayo Cometa (Tabla 17) en los grupos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabla 16. Resultados de los parámetros seminales del espermatograma; según la edad y la conclusión.

	G1 = 20-30 años (n = 40)		G2 = 31-40 años (n = 60)		G3 = 41-55 años (n = 27)	
	N 72.5% (n=29)	P.S.A 27.5% (n=11)	N 41.7% (n=25)	P.S.A 58.3% (n=35)	N 14.8% (n=4)	P.S.A 85.2% (n=23)
Progresivos	59.45±10.72	55.09±16.54	61.72±9.75	48.54±18.17	56±7.87	50.08±17.55
No Progresivos	10.66±6.48	13.36±14.30	9.52±5.15	12.46±8.30	10.25±2.87	11.30±8.00
Inmóviles	29.21±9.99	31.18±7.33	29.12±8.39	38.8±15.97	33.75±9.74	38.61±17.60
Vivos	77.31±9.88	75.54±6.58	78.92±5.29	71.51±12.26	78.5±10.66	71.87±12.55
Muertos	22.69±9.88	24.45±6.58	21.04±5.35	28.77±12.46	21.5±10.66	28.13±12.55
Concentración (ml)	64.93±35.09	50.74±39.38	66.86±42.29	36.26±30.50	46.43±17.45	48.32±35.38
Concentración	209.65±148.36	139.57±122.88	240.98±184.95	96.52±90.73	96.25±67.88	133.93±127.63
Normales	6.41±1.48	4.18±1.08	6.32±1.52	3.47±1.64	6±1.15	3.83±1.03
Anormales	93.55±1.48	95.82±1.08	93.76±1.59	93.91±15.44	94±1.15	96.17±1.03

$\bar{X} \pm DE$, N: Normozoospermia, P.S.A: Parámetros seminales alterados.

Tabla 17. Los resultados de los parámetros del ensayo Cometa; según la edad y la conclusión.

	G1 = 20-30 años (n = 40)		G2 = 31-40 años (n = 60)		G3 = 41-55 años (n = 27)	
	N (n=29)	P.S.A (n=11)	N (n=25)	P.S.A (n=35)	N (n=4)	P.S.A (n=23)
Porcentaje de intensidad	13.72±16.82 7.58	33.74±21.19 39.03	26.73±21.98 31.95	30.85±18.02 33.05	35.56±20.69 43.17	33.05±20.95 31.47
Momento de la cola	2.58±3.32 1.08	6.65±4.96 6.71	5.18±4.71 5.58	5.99±3.79 5.71	6.93±4.27 7.23	6.98±5.46 6.01
Longitud de la cola	32.38±18.43 28.21	43.36±13.88 45.64	38.71±17.53 43.97	43.26±13.85 44.87	42.21±16.52 46.41	41.72±13.28 44.10

$\bar{X} \pm DE/\text{Mediana}$, N: Normozoospermia, P.S.A: Parámetros seminales alterados.

Se agrupó también a todos aquellos pacientes con parámetros seminales alterados (Hipospermia, Oligozoospermia, Teratozoospermia, Astenozoospermia y Necrozoospermia), comparándose con el grupo de Normozoospermia (Figura 26) y se evidenció diferencia significativa.

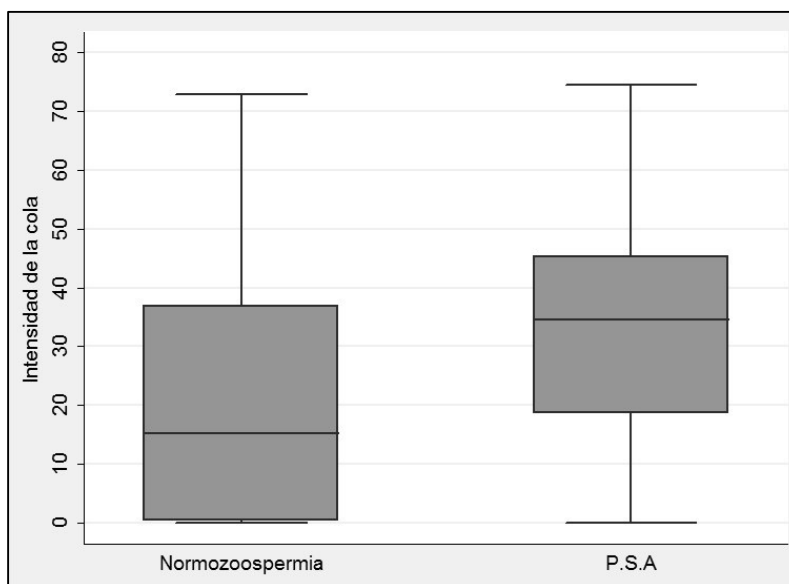


Figura 26. El porcentaje de intensidad de ADN en la cola Vs. Parámetros seminales ($p=0.0015$), muestran diferencia significativa (Mann-Whitney).

En el estudio se observa que los valores del ensayo Cometa de los pacientes normozoospermicos no presentan diferencias significativas con los pacientes astenozoospermicos ($p = 0.0612$), necrozoospermicos ($p = 0.1322$) o pacientes oligozoospermicos ($p= 0.8332$). En el caso de los pacientes teratozoospermicos (Figura 27) si mostraban diferencias significativas con el porcentaje de intensidad de ADN en la cola ($p= 0.0008$).

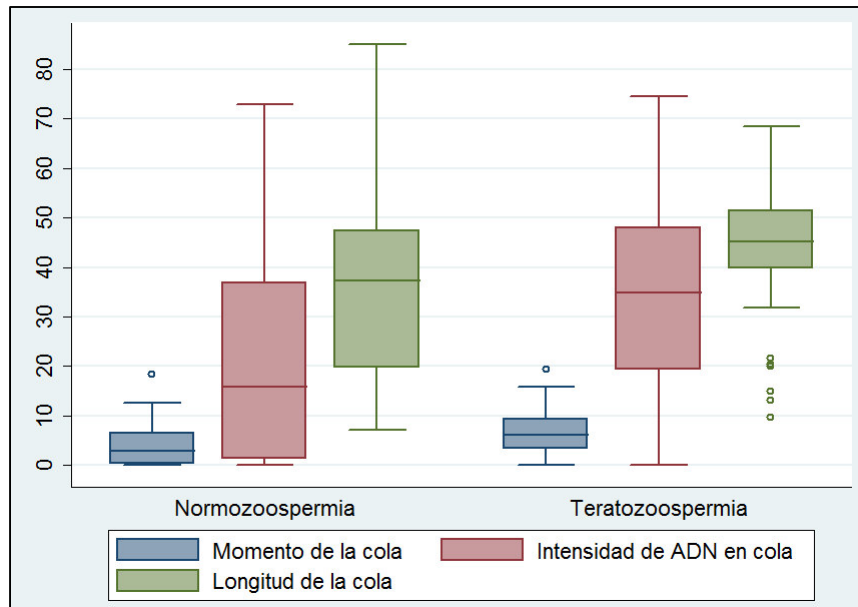


Figura 27. Normozoospermia Vs. Teratozoospermia, diferencias en los parámetros del ensayo Cometa ($p= 0.0008$).

Se probó también, que mientras más parámetros seminales alterados, mayor es el porcentaje de intensidad de ADN en la cola ($p=0.0330$), como se observa en la siguiente imagen:

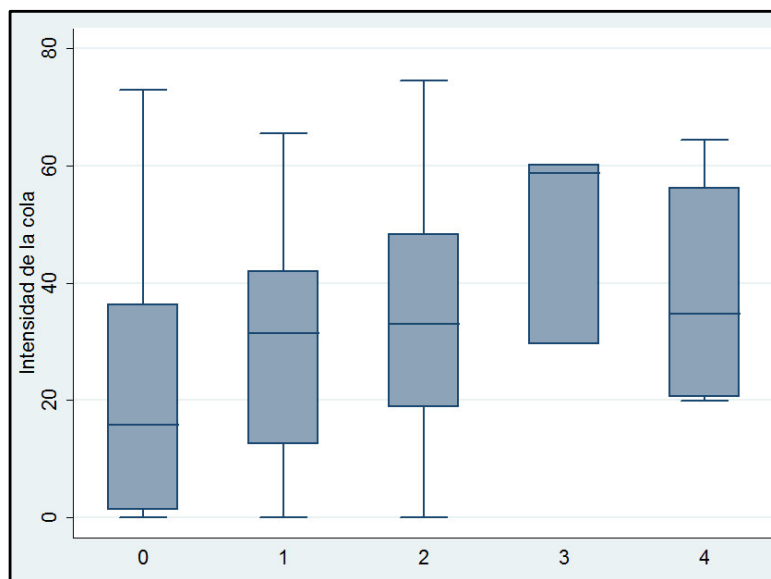


Figura 28. Pacientes con normozoospermia y con uno, dos, tres o cuatro parámetros alterados Vs. el porcentaje de intensidad de ADN en la cola.

Se realizaron las pruebas de correlación de *Pearson* (Tabla 18), y se encontró correlación positiva (Figura 31), que representa si una variable aumenta la otra también (sentido directo), correlación negativa (Figura 29 y 30), si una variable aumenta la otra disminuye (sentido inverso).

Tabla 18. Se muestra el tipo de correlación (valor r) entre los parámetros seminales y del ensayo Cometa.

	Progresivos	Vitalidad	Concentración	Normal	Momento	Intensidad
Vitalidad	0.5802					
Concentración	0.3321	0.1883				
Normal	0.1282	0.1166	0.2267			
Momento	-0.1112	-0.2039	-0.1054	-0.2846		
Intensidad	-0.1083	-0.1948	-0.1172	-0.2710	0.9719	
Longitud	-0.0724	-0.1677	-0.1241	-0.2171	0.7434	0.7172

Se muestran a continuación algunos ejemplos de correlación negativa:

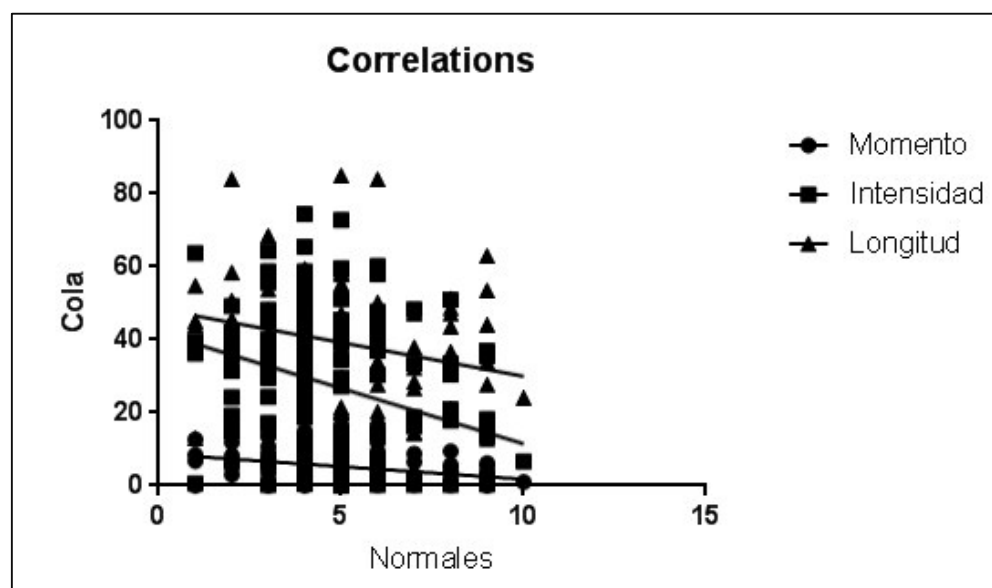


Figura 29. Correlación de la morfología espermática y los parámetros del ensayo Cometa, en los tres casos, la correlación es negativa.

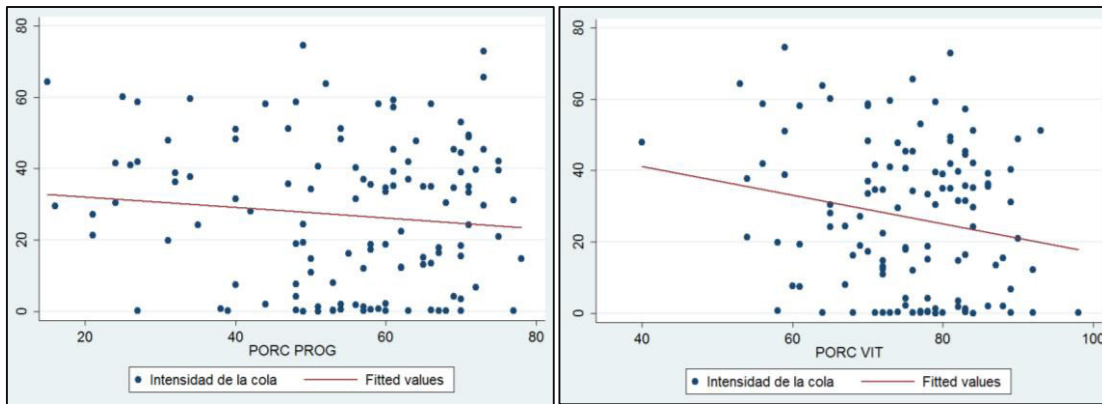


Figura 30. Correlación de la movilidad ($r=-0.1083$), la vitalidad ($r=-0.1948$) espermática y los parámetros del ensayo Cometa, la correlación es negativa

Además, se muestra los parámetros más importantes del ensayo Cometa como el momento de la cola y el porcentaje de intensidad de ADN en la cola (Figura 31) los cuales tienen una correlación positiva.

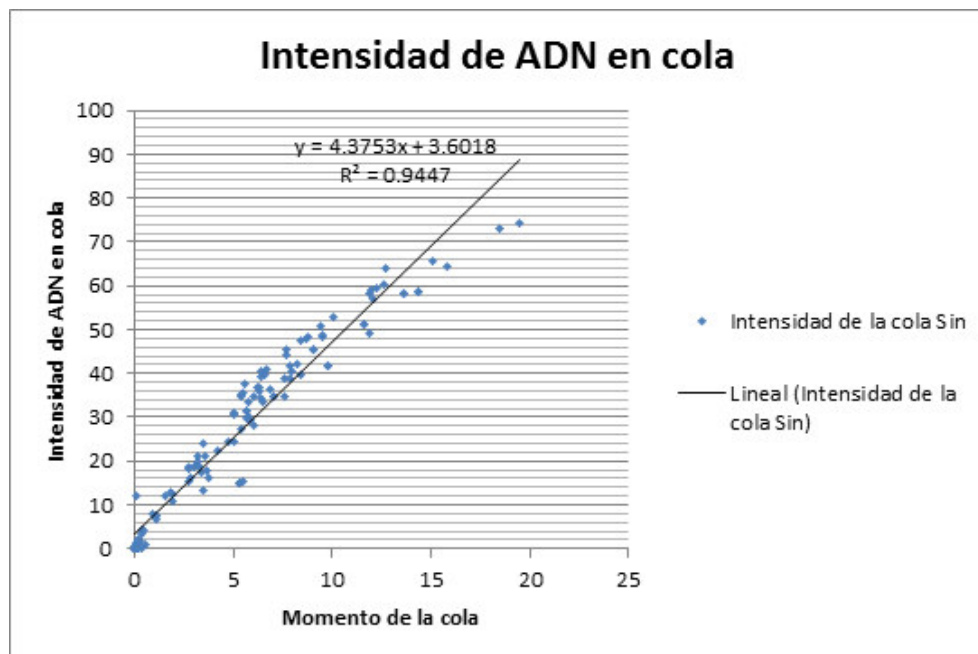


Figura 31. Correlación muy fuerte (valor cercano a 1) y estadísticamente significativa entre ambos parámetros momento de la cola y el porcentaje de intensidad ($r=0.9719$).

6) EVALUACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO ASOCIADO A FACTORES DE RIESGO OCUPACIONAL Y OCUPACIONES.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar, si los factores de riesgo ocupacional a los cuales los pacientes se encuentran expuestos a diario causan algún daño a nivel de ADN espermático.

En el punto 2 de los resultados se evidenció que es muy difícil determinar si cada riesgo ocupacional produce daño directo a nivel de ADN espermático, sin embargo, la exposición a más de un factor de riesgo ocupacional (Figura 32), de acuerdo con las preguntas realizadas (8 factores) se asocia a un mayor daño a nivel de ADN espermático. Los pacientes con ningún tipo de exposición (0), a más exposiciones (1-8) mostraban diferencia significativa, como se puede observar en la figura siguiente:

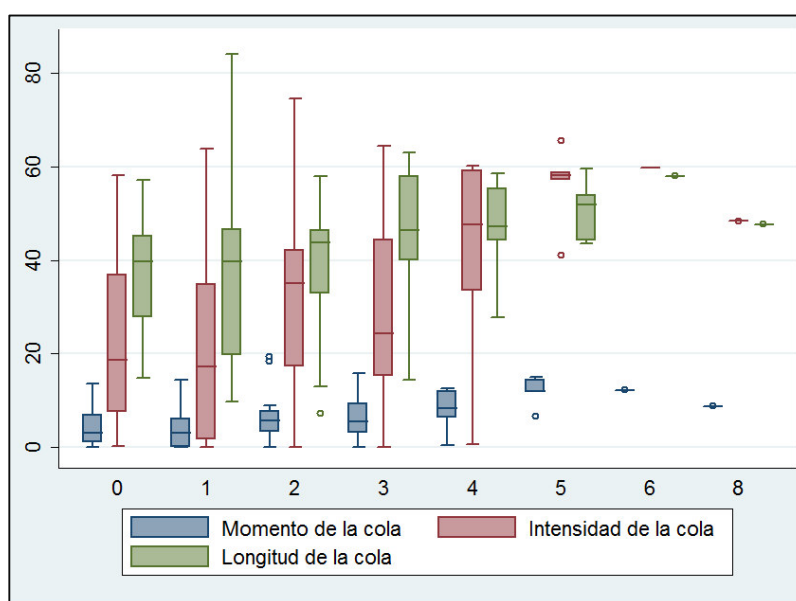


Figura 32. A mayor exposición a factores de riesgo en el trabajo, mayor será el porcentaje de intensidad ($p=0.0014$), momento de la cola ($p=0.0013$) y longitud de la cola ($p=0.0304$).

La exposición más frecuente y de bajo riesgo fue sedentarismo, y las de mayor riesgo fueron, metales pesados, ambientes térmicos (estrés térmico), vibraciones mecánicas (mano-brazo o cuerpo), pinturas o barnices (esmaltes, temple o lacas), y las menos frecuentes fueron radiaciones (rayos X) y campos electromagnéticos (radiofrecuencia, antenas de radiodifusión).

El grupo control (**Sin trat**), participantes con fertilidad probada y con ocupaciones de bajo riesgo, a quienes se les evaluó los tres parámetros del ensayo Cometa (Figura 33: **A: Momento de la cola**, **B: Porcentaje de intensidad de ADN en la cola** y **C: Longitud de la cola**), adicionalmente se les trató con H_2O_2 (**Con = 1**), observando claramente la diferencia significativa ($p < 0.05$). En el grupo de pacientes, los individuos del estudio se dividieron según sus grupos ocupacionales (bajo, mediano y alto riesgo) según tratamiento (con o sin Peróxido de Hidrógeno, **Con = 1**). Los pacientes que no recibieron tratamiento (**Sin trat**), según sus ocupaciones (en los grupos de mediano y alto riesgo) con respecto al control ($n=8$) mostraron diferencia significativa ($p=0.04$) para el parámetro de porcentaje de intensidad de ADN en la cola (**rectángulos rojos**). A diferencia de la comparación de los pacientes de bajo riesgo ocupacional y el control sin tratamiento (**Sin trat**) que no muestran diferencias significativas.

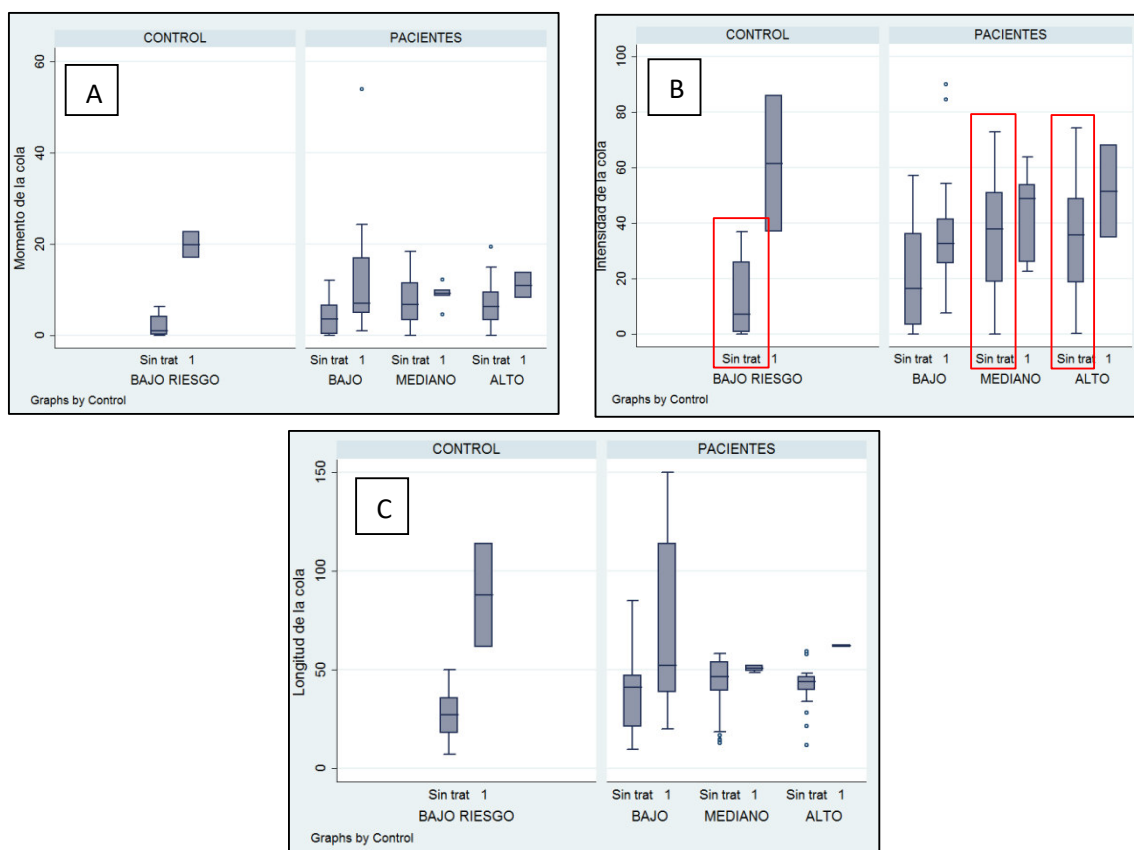


Figura 33. Parámetros de daño a nivel de ADN según la ocupación, grupos de pacientes y control según tratamiento.

La siguiente tabla nos permite observar que los pacientes con normozoospermia y parámetros seminales alterados (Tabla 19) no difieren significativamente en relación a los parámetros del ensayo Cometa en el grupo de mediano ($p=0.9736$) y alto ($p=0.6122$) riesgo, pero sí, en el grupo de bajo riesgo ($p=0.0175$). El grupo de normozoospermia de bajo riesgo ocupacional tiene el mayor número de pacientes ($n=28$) en el rango de menor edad (De 20 a 30 años).

Si se compara solo a los pacientes con normozoospermia según ocupación (bajo, mediano y alto riesgo) se evidencia diferencia significativa ($p=0.001$), al igual si comparamos a los pacientes con parámetros seminales alterados ($p=0.001$). Es decir, las ocupaciones con mayor riesgo tienen más daño a nivel de ADN espermático, a pesar de tener parámetros seminales normales.

Tabla 19. Pacientes con normozoospermia y parámetros seminales alterados según ocupación.

OCUPACIONES		Normozoospermia ($p=0.001^*$)	Parámetros seminales Alterados ($p=0.001^*$)
BAJO RIESGO ($p=0.0175^*$)		$n=40$ (59.7 %) ^a	$n=27$ (40.3 %) ^a
	MC	2.34 ± 3.10 .77	4.03 ± 4.08 3.07
	PI	12.04 ± 15.33 5.36	20.48 ± 17.12 18.69
	LC	32.41 ± 19.70 27.69	37.57 ± 16.12 39.74
MEDIANO RIESGO ($p=0.9736$)		$n=10$ (25.64 %) ^b	$n=29$ (74.36 %) ^b
	MC	6.84 ± 5.43 6.71	7.23 ± 3.63 6.63
	PI	34.82 ± 22.38 39.85	37.23 ± 15.45 37.26
	LC	40.21 ± 14.35 43.97	45.53 ± 9.32 45.13
ALTO RIESGO ($p=0.6122$)		$n=8$ (38.1 %) ^b	$n=13$ (61.9 %) ^b
	MC	8.33 ± 2.57 7.73	9.70 ± 4.93 9.74
	PI	44.32 ± 10.62 42.34	44.96 ± 19.09 42.13
	LC	46.12 ± 6.60 46.79	47.53 ± 12.37 51.79

MC: Momento de la cola, PI: Porcentaje de intensidad y LC: Longitud de la cola.

$\bar{X} \pm DE/\text{Mediana}$, *p-valor estadísticamente significativo ($p<0.05$).

VI. DISCUSIÓN

A pesar de que los factores de riesgo ocupacional son importantes en la salud reproductiva, porque el trabajo es la actividad que el ser humano desarrolla durante más tiempo en su vida, en el Perú, los estudios asociados a ocupaciones, ADN espermático y calidad seminal aún no se desarrollan con la frecuencia que existen en otros países (Jensen *et al.* 2006, Vaziri *et al.* 2011, Lepecka-Klusek *et al.* 2011, Jurewicz *et al.* 2014, entre otros).

En el presente estudio el uso del pre-cuestionario y del cuestionario fue esencial para conocer características de la población, tales como los hábitos, la edad, la duración de la exposición, estilo de vida, entre otras cosas; como lo sugiere Altakroni, 2014; debido a que estas características pueden influenciar en los biomarcadores de efecto genotóxico en estudios de biomonitorización de poblaciones ocupacionales expuestas a agentes tóxicos. Se generaron diferentes grupos y subgrupos dependiendo principalmente del cuestionario, los parámetros seminales y los parámetros del ensayo Cometa (Lepecka-Klusek *et al.* 2011).

Debido a que hábitos de tabaquismo (Sepaniak *et al.* 2006, Collodel *et al.* 2010), alcoholismo, consumo de drogas o medicamentos (Sharpe 2010), son controversiales en las investigaciones se consideraron como factores de exclusión evitando así cualquier tipo de sesgo o influencia sobre los resultados (Dupont *et al.* 2013). Considerando también que el humo del tabaco presenta agentes químicos nocivos para la salud y existen estudios que señalan la influencia del tabaquismo sobre alteraciones citogenéticas (Lichtman 2007), frecuencia de micronúcleos cuando se compara con los no fumadores (Pereira *et al.* 2015). Por ello, fumar fue una variable importante. En el presente estudio se consideraron a los fumadores ocasionales (fumadores sociales) y no fumadores, encontrando diferencia significativa entre estos grupos a pesar de no ser fumadores frecuentes, resultados similares a Sepaniak *et al.* 2006. De la misma forma, existen estudios que vinculan el consumo de alcohol con un aumento del estrés oxidativo, en contraste con Sharpe, 2010; que guardan estrecha relación con eventos genotóxicos, incluso tienen un impacto significativo en recuento de espermatozoides, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre el consumo ocasional o no consumo.

En relación con la edad y el daño a nivel de ADN espermático, se encontró que existe un mayor índice en los parámetros del ensayo Cometa en el subgrupo de personas con mayor edad (G3), lo cual guarda relación con estudios previos (Schmid *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2015). Para el análisis de esta variable, se crearon tres grupos (n=127), G1 = 40 (20-30 años), G2 = 60 (31-40 años), G3 = 27 (41-55 años), verificando la existencia de un aumento significativo de daño a nivel de ADN espermático. Con respecto a los parámetros seminales no se encontraron diferencias para este factor como menciona Portella *et al.* 2013. De acuerdo con Schmid *et al.* 2007 es posible que los varones mayores produzcan más espermatozoides con daño en el ADN como consecuencia del aumento del estrés oxidativo asociado a la edad en sus tractos reproductivos. Esto guarda relación al tiempo en años en el trabajo, aquellos pacientes que tengan más años trabajando, tendrán un daño mayor ($p = 0.010$).

Otro factor importante fue que el 27.59% de participantes (n=8) del grupo de normozoospermia (G1), tienen hijos y el porcentaje de intensidad de ADN en la cola fue de 13.06 ± 14.96 , ellos no refirieron haber tenido abortos. Sin embargo, los demás grupos, sean normozoospermicos o con parámetros seminales alterados refirieron haber tenido abortos espontáneos y presentaron un porcentaje de intensidad de ADN en la cola superior a 26 %. Confirmando así los resultados de Kumar *et al.* 2012, que encontraron una relación directa entre el daño en el ADN espermático y el número de abortos (Figura 13). Quintero *et al.* 2015 menciona también que un espermatozoide con un daño severo o mínimo en su ADN puede fecundar a un ovocito, alterando el desarrollo del embrión, provocando un aborto espontáneo en un estadio más tardío o dar lugar a un niño con anomalías.

En el presente estudio se trabajó con muestras concentradas, eliminando el plasma seminal, lo que permitió trabajar con una muestra seminal total de los pacientes, por ser un estudio descriptivo, a diferencia de otros estudios que trabajan con muestras separadas por gradientes de densidades o *swim up* (Amirí *et al.* 2012), ya que la apoptosis espermática tiene como consecuencia disminuir la movilidad de la célula y fragmentar el ADN nuclear (Schulte *et al.* 2010 y Aitken & Koppers 2011). Si bien es cierto, el espermatograma es el examen inicial de la evaluación masculina, es necesario acompañarlo con un examen de fragmentación de ADN espermático, ya que existen casos de necrozoospermia asociados a una alta fragmentación (Acosta & Dueñas 2014), sin embargo, existen otros estudios en los cuales no se asocia (Irvine *et al.* 2000, Cortés

et al. 2007). Se consideró centrifugar solo una vez ya que se han descrito que en los protocolos con varias centrifugaciones de los espermatozoides podrían estar induciendo daño iatrogénico (Twigg *et al.* 1998) y que aumentando el tiempo de incubación de las muestras a 37° C incrementaría significativamente el daño en el ADN, lo que induciría la apoptosis a través de la acción de las EROs (Jayaraman *et al.* 2012), además para evitar cambios en el pH 7,5, se empleó las recomendaciones de la OMS, considerando evaluar antes de los 60 minutos.

También se utilizó muestra fresca ya que se ha demostrado que el ADN fragmentado tiende a aumentar tras una congelación-descongelación (Gosálvez *et al.* 2011). Para evitar variaciones en el protocolo, adicionalmente se recomendaron de 3 a 7 días de abstinencia, ya que es posible que a más días de abstinencia el índice de fragmentación sería elevado (Gosálvez *et al.* 2009), solo un paciente tuvo 10 días de abstinencia, sin resultados relevantes y solo tres pacientes fueron hipospérmicos debido a que los días de abstinencia fueron de 1 a 3.

Dentro de los materiales utilizados, se empleó DTT necesario para destruir los enlaces disulfuro entre las protaminas adyacentes que envuelven el ADN del espermatozoide humano y causan su alta condensación. Se intentó trabajar solo con DTT y/o con Proteinasa K, resultando favorable el uso de este último componente como en Altakroni, 2014, obteniendo resultados similares. Fue necesaria una incubación en tampón de lisis que contenía Proteinasa K (100 µg / ml) + DTT para asegurarse de que todas las protaminas se digieran y eliminen (Tabla 21).

En la mayoría de los espermatozoides analizados el ADN migró como cola de cometa pequeño, mediano o grande, pocos participantes del estudio presentaron el ADN casi integro o intacto. La razón puede deberse a que el espermatozoide humano presenta sitios lábiles (Mudry & Carballo 2006), lugares propensos a daño. Además, se debe considerar la sensibilidad de la prueba y la variabilidad en diversos laboratorios (Grandjean *et al.* 1994, Hwang & Bowen 2007). Por ello, para evitar pensar en un daño inducido por la metodología, se utilizaron pacientes con fertilidad probada y normozoospermia, los cuales dejaron muestra durante el proceso del estudio en diferentes ocasiones y también se evaluó el efecto del peróxido de hidrogeno como inductor a daño del ADN espermático, las muestras de semen fueron expuestas *in vitro* a dos dosis del inductor, cabe resaltar que la prueba permite detectar un amplio rango de daños a nivel de ADN (Chohan *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2010), y es un buen biomarcador

en toxicología reproductiva y hay estudios que comprueba que la exposición ambiental aumenta el daño (Lepecka-Klusek *et al.* 2011). En el estudio, los participantes adicionales, mostraron diferencia con relación a las parejas atendidas en los respectivos centros con problemas de infertilidad expuestas a diferentes factores de riesgo ocupacional, por ello, es de esperar que los efectos genotóxicos inducidos como la exposición a factores químicos o a factores físicos según el contacto y más aún a largo plazo, en los pacientes causen un daño mayor (Singh *et al.* 2003).

Para el análisis del daño en el ADN espermático, se empleó el momento, la longitud y el porcentaje de intensidad de ADN en la cola por ser las medidas más frecuentes del ensayo de Cometa. Pero, en la mayoría de los casos se utilizó el porcentaje de intensidad de ADN en la cola porque es un parámetro más útil, ya que tiene un comportamiento lineal, no se ve afectado por el umbral ajustes, y permite la discriminación del daño sobre el más amplio rango (en teoría, de 0% a 100% de intensidad de ADN en la cola) (Romero 2012) además, fue un criterio de valoración principal recomendado en el Taller internacional sobre pruebas de genotoxicidad en el 2005 (San Francisco, California) como la mejor medida del ensayo de Cometa y dado que, la media no es representativa por completo en los casos de una distribución no normal, los valores descriptivos fueron también: la mediana, el percentil 25 y percentil 75.

Para los factores de riesgo ocupacional, estudios como los de Tas *et al.* 1996, Magnusdottir *et al.* 2005, Jurewicz *et al.* 2014 nos hablan de las diferentes exposiciones que producen daños a nivel reproductivo: a metales pesados, pesticidas, herbicidas, disolventes inorgánicos, exceso de vapores, combustión - humo, hidrocarburos. Incluso exposición a riesgos físicos como sedentarismo, radiaciones, calor, vibraciones mecánicas entre otros. Considerando que, en el presente trabajo, de los pacientes expuestos, el 40.94% mencionan que no existe ningún tipo de control a estos factores de riesgo ocupacional, se hace aún más importante el estudio.

El calor es un efecto físico dañino que puede alterar la estructura de ciertas proteínas sensibles al calor, aunque es difícil que se pueda producir rupturas en el ADN, el calor puede interferir en la reparación del daño en el ADN y de esta manera afectar a la estructura de la cromatina. Específicamente en los testículos, la exposición a temperaturas elevadas se asocia a un incremento de EROs debido a la peroxidación lipídica (Jensen *et al.* 2006, Song & Seo 2006). Como resultado del estrés por calor la calidad de semen disminuye, incrementando la incidencia de espermatozoides maduros

anormales, aumentando significativamente la muerte de células germinales y una disminución en el número de espermatozoides en el eyaculado (Mieusset & Bujan 1995). Por ejemplo, la exposición ocupacional puede ocurrir en varones que trabajan en ambientes con temperaturas elevadas, como panaderos y soldadores (Oliva *et al.* 2001) y también en profesionales que impliquen estar largos períodos de tiempo sentados, como es el caso de los taxistas, de manera independiente el calor no fue significativo en el presente estudio. El tipo de ropa utilizada también pueden causar un aumento de la temperatura escrotal (Mieusset *et al.* 2007), en el presente estudio se evidencio diferencia significativa en los pacientes que al NO estar expuestos NO usan equipos de protección personal de aquellos que a pesar de SI estar expuestos NO usan equipos de protección personal ($p=0.0394$).

Dentro de los resultados los pacientes que mencionaron estar expuesto a ambientes térmicos, vibraciones mecánicas, pesticidas, pinturas o barnices, hidrocarburos y/o campos electromagnéticos se observa un aumento en el porcentaje de intensidad de ADN en la cola, a diferencia de los pacientes que mencionaron no estar expuestos, sin embargo, esta diferencia no es significativa, ya que los pacientes no solo estaban expuestos a un riesgo específico, si no muchas veces a más de uno (Tabla 8 y figura 16). Es decir, las exposiciones identificadas no fueron independientes de cada una, a diferencia de estudios como Radwan *et al.* 2016 que encuentran diferencias significativas entre estrés ocupacional, parámetros seminales y fragmentación de ADN espermático. Por ello, se agruparon a todos los pacientes expuestos a algún factor de riesgo de los que no (Tabla 22). Por esta razón se sugiere incrementar el número de pacientes, además de centrarse en una población específica como personal dispensador en grifos, taxistas o personal de mina. Otros factores de riesgo son los productos químicos utilizados con frecuencia en las industrias, como la exposición a líquidos de limpieza o exposición a ftalatos (Hauser *et al.* 2007). Exposición a estireno medido por el ensayo Cometa alcalino (Migliore *et al.* 2002) e insecticidas que se asociaron con un aumento en el daño del ADN espermático medido por el ensayo Cometa neutral (Meeker *et al.* 2008), y que en el presente estudio no se evidenció una variación de manera independiente.

Otro objetivo fue asociar los factores de riesgo ocupacional a parámetros seminales, no encontrando diferencia significativa, como en otros estudios (Vaziri *et al.* 2011). Es posible que se deba al pequeño número de muestras, al tiempo de exposición y a que los factores estudiados no sean eventos aislados. En el caso de los pacientes, que trabajan con una

excesiva exposición a campos electromagnéticos que emiten los equipos electrónicos, como ingenieros de sistemas, se observó que es probable que la función testicular este siendo dañada (Tabla 8), por la disminución en el número de espermatozoides y el aumento en el daño a nivel de ADN espermático sin embargo no se pudo comprobar que fuera significativa. Sin duda, los pacientes con exposición a rayos X, radiaciones ionizantes y campos electromagnéticos incrementan la fragmentación de ADN espermático y altera la calidad seminal (Valdivia *et al.* 2014).

De acuerdo al cuestionario (Ver Anexo N° 2), se logró agrupar a los pacientes de diversas formas, una agrupación ya mencionada fue, pacientes expuestos y no expuestos (A algún tipo de exposición), encontrando diferencia significativa como en estudios anteriores (Meeker *et al.* 2008; Lepecka-Klusek *et al.* 2011; Altakroni 2014) a nivel de daño en el ADN espermático, los parámetros seminales como movilidad, vitalidad y concentración no mostraron diferencia significativa para ambos grupos, sin embargo la morfología si mostró diferencia significativa. También se puede observar que a mayor exposición a factores de riesgo ocupacional (Figura 32) mayor será el daño a nivel de ADN espermático.

Otra agrupación de los pacientes fue en tres categorías: ocupaciones de bajo, mediano y alto riesgo, según sus respuestas (Vaziri *et al.* 2011), evidenciando diferencia significativa en los parámetros de daño a nivel de ADN espermático; sin embargo, no se encontró diferencia significativa a nivel de parámetros seminales, como los encontrados por Lepecka-Klusek *et al.* 2011; además, los subgrupos tenían valores por encima del límite de referencia establecido por la OMS.

Con respecto al grupo de pacientes con parámetros seminales alterados a diferencia de los pacientes normozoospermicos (Figura 27), el daño a nivel de ADN espermático es significativamente mayor, los resultados fueron similares con Acosta & Dueñas, 2014. El momento, el porcentaje de intensidad de ADN, y la longitud de la cola se correlacionaron negativamente con el porcentaje de espermatozoides progresivos ($r=-0.1112$, $r=-0.1083$, $r=-0.0724$ respectivamente), el porcentaje de espermatozoides vivos ($r=-0.2039$, $r=-0.1948$, $r=-0.1677$), la concentración de espermatozoides ($r=-0.1054$, $r=-0.1172$, $r=-0.1241$) y la morfología ($r=-0.2846$, $r=-0.2710$, $r=-0.2171$). Es decir, los parámetros del ensayo Cometa disminuían si los valores de los parámetros seminales eran más altos. Sin embargo, a diferencia de Acosta *et al.* 2015 que encuentra diferencia en pacientes oligozoospermicos, astenozoospermicos, necrozoospermicos con los normozoospermicos, en el presente estudio solo se encontró diferencia con los

teratozoospermicos. La morfología de los espermatozoides fue el parámetro seminal más alterado (Tabla 16). El 44.88% de los pacientes presentaron teratozoospermia, en algunos casos acompañado de otras alteraciones. Es de esperar que, a más parámetros seminales alterados, exposición a más factores de riesgo ocupacional y a más años trabajando los valores de daño a nivel de ADN fueran mayores.

VII. CONCLUSIONES

- La suma de los factores de riesgo ocupacional está asociada al daño en el ADN espermático en pacientes con problemas de infertilidad.
- Las ocupaciones de alto riesgo como, agricultores, mecánicos, cocineros, soldadores, taxistas, electricistas, electrónicos y operarios (Químicos) presentan un mayor daño a nivel de ADN espermático.
- Los trabajadores que mencionan estar expuestos ambientes térmicos, vibraciones mecánicas, pesticidas, pinturas o barnices, hidrocarburos y/o campos electromagnéticos presentan un daño a nivel de ADN espermático mayor que los trabajadores no expuestos.
- Aquellos trabajadores de mayor edad (41-55 años) presentaron un daño mayor a nivel de ADN espermático en comparación con los trabajadores de menor edad, lo que indica la influencia del daño genético acumulativo a causa de la edad.
- El consumo de tabaco ocasional evidenció un incremento de daño a nivel de ADN.
- Los pacientes con abortos recurrentes presentan mayor daño a nivel de ADN espermático.
- La suma de los factores de riesgo ocupacional puede jugar un papel importante en la calidad del semen a nivel de morfología.

VIII. RECOMENDACIONES

- El número relativamente pequeño de pacientes que participaron en este estudio no permitió proporcionar evidencia de un efecto nocivo de otros factores como enfermedades, hábitos, alimentación o los factores de riesgo de manera individual, en la calidad de los espermatozoides, por ello, se recomienda incrementar la muestra, debido a que el presente estudio es preliminar.
- Continuar con la validación del ensayo cometa para lograr que sea una prueba diagnóstica de infertilidad.
- Para próximos estudios, sería interesante que los pacientes además de dejar una muestra de semen, sea posible tomarles una muestra de sangre, y a si observar el daño a nivel de leucocitos y verificar correlación.
- Los factores ocupacionales deben ser evaluados cuando se realiza el estudio integral del varón infértil.
- El presente estudio busca concientizar a la población, la importancia de la salud reproductiva en el trabajo, regulando la exposición a los factores de riesgo ocupacional y la utilización de equipos de protección personal.
- Es necesario implementar una política de salud, incluso los médicos podrían brindar asesoramiento sobre los cambios de estilo de vida para promover la salud y brindar recomendaciones como el uso de ropa interior suelta.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, L., & Dueñas, J. (2014). Correlación entre los parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático en varones atendidos en un centro de fertilidad. *Rev. Iberoamericana de Fertilidad*, 1(31).
- Acosta, L., Rivas, C., Chiscul, L., & Díaz, J. (2015). Correlación entre los parámetros seminales, fragmentación de ADN espermático y estrés oxidativo en pacientes atendidos en un centro de fertilidad en el norte del Perú. *Iberoamericana de Fertilidad*, 24-34 (32).
- Aitken, R. J., & Koppers, A. J. (2011). Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), 36–42.
- Aitken, R. J., Harkiss, D., & Knox, W. (1998). A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci*, 111:645–656.
- Aitken, R. J., Jullis, G. N., & McLachlan, R. I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germinal. *Int J Androl*(32), 46 – 56.
- Altakroni, B. (2014). *Occupational and environmental exposures, sperm DNA damage and infertility*. Faculty of Medical and Human Sciences University of Manchester: Thesis for the degree of Doctor of Philosophy.
- Alvarez, J. G., & Storey, B. t. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 42(3):334-46.
- Alvarez, J. G., & Gosálvez, J. (2011). Role of protamine disulfide cross linking in counteracting oxidative damage to DNA. *Springer Science and Business Media*.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, 7:145-173.
- Amiri, I., Ghorbani, M., & Heshmati, S. (2012). Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Methods. *J Clin Diagn Res*, 1451–1453.
- Arribas, M. (2004). Diseño y validación de cuestionarios. *Matronas Prof*, 17(5), 23-29. Retrieved from http://enferpro.com/documentos/validacion_cuestionarios.pdf.
- Auger, J., Czyglik, F., Jouannet, P., & Kunstmann, J. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*(332), 281-285.

- Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in human sperm. *J Cell Bio*, 93, 298–305.
- Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S., & Saunders, P. T. (2015). Impact of a mildscrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, 129: 505-514.
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & McGraw-Hill, H. L. (2013). *Ganong. Fisiología médica*. España: Interamericana de España S.L. 24.
- Braun, R. E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet*(28), 10-12.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keidingg, N., & Skakkebaek, H. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. *BMJ*(305), 609-613.
- Chohan, K., Griffin, J., Lafromboise, M., & De Jonge, C. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*, 27, 53–59.
- Claman, P. (2004). Men at risk: occupation and male infertility. *Fertil Steril*, 19-26.
- Collins, A. R. (2002). The Comet Assay. Principles, Applications, and Limitations. In D. V.V., *In Situ Detection of DNA Damage. Methods in Molecular Biology*. (pp. 163-177). Humana Press.
- Collodel, G., Capitani, S., Pallmmolli, A., & Giammerini, V. (2010). Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. *J Androl*, 108-113.
- Cortés, G. E., Dávila, R. M., López, F. C., Fernández, J., & Gosá. (2007). Evaluación del daño en el ADN espermático. *ActasUrol*, 2(31), 120-31.
- Dadoune, J. P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech*, 61, 56–75.
- Dey, S. (2010, Jul). Infertility rises at alarming pace in India. *English.news.cn*, http://http://news.xinhuanet.com/english2010/world/2010-07/16/c_111963155.htm.
- Dohle, G. R., Diemer, T., Giwercman, A., Jungwirth, A., Kopa, Z., & Krausz, C. (2010). Guía clínica sobre la infertilidad masculina. *European Association of Urology*.
- Dupont, C., Faure, C., Sermondade, N., Boubaya, M., Eustache, F., Clément, P., . . . Benzacken, B. (2013). Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl*, 5(15), 622-625.
- Duty, S. M., Singh, N. P., & Silva MJ, M. J. (2003). The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environmental Health Perspectives*, 9(111), 1164-1169.
- Enciso, L. M. (2009). *La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamífero*. Universidad Autónoma de Madrid: Tesis Doctoral.

- ESHRE Capri Workshop Group. (2005). Fertility and ageing. *Human Reproduction Update*, 11(3), 261-276.
- Evenson , D. P., Larson, K. L., & Jost, L. K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*(23), 25–43.
- Ferlin, A., Raicu, F., Gatta , V., Zuccarello , D., & Palka, G. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reprod Bio Med*(14), 734-745.
- Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Wyrobek , A. J., Rempel , D. M., & Ames, B. N. (1995). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res*(351), 199-203.
- García , A. M. (1999). Condiciones de trabajo y reproducción: un recorrido por las evidencias. *Arch Prev Riesgos Labor*, 19-25. 2(1).
- Gilbert. (2003). *Biología del desarrollo* (7ma ed.). Médica Panamericana.
- Gosálvez, J., Cortés-Gutiérrez , E. I., Núñez, R., Fernández, J. L., Caballero, P., & López-Fernández, C. (2009). A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertility and Sterility*, 92: 1915-1919.
- Gosálvez, J., Núñez, R., & Fernández, J. L. (2011). Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia* , 43(6): 373–377.
- Grandjean , P., Brown , S., Reavey , P., & Young, D. (1994). Biomarkers of chemical exposure: state of the art. *Clin Chem*(40), 1360-1362.
- Gutiérrez , G. R. (2007). Daño al ADN espermático: aspectos clínicos y biológicos. *Rev Cubana Endocrinol*, 2 (18).
- Gutiérrez, C. (2017, Abril). *Sitio Web: ANDINA*. Retrieved from ANDINA: <https://andina.pe/agencia/noticia-ex-maternidad-lima-brinda-tratamientos-complejos-fertilidad-a-bajo-costo-477234.aspx>
- Haines, J. L., Terwedow, H. A., Burgess, K., Pericak-Vance, M. A., Rimmmler, J. B., Martin, E. R., . . . Hauser, S. L. (1998). Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet*, 7:1229–1234.
- Hauser, R., Meeker , J. D., Singh , N. P., Silva , M. J., Ryan, L., Duty, S., & Calafat, A. M. (2007). DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod*, 22, 688-695.
- Hefferina, M. L., & Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair*, 639-648.

- Henkel, R., Hajimohammed, M., Stalf, T., Hoogendijk, C. F., Mehnert, C., Menkveld, R., . . . Kruger, T. F. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*, 4:965–972.
- Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammed, M., Stalf, T., Hoogendijk, C. F., Mehert, C., . . . Kruger, T. F. (2003). DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproductive technology. *RBM Online*, 7:477–484.
- Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., . . . Kruger, T. (2003). DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reproductive BioMedicine*, 7(4) 477–484.
- Hidalgo, C., Tamargo, C., & Diez, C. (2005). *Análisis del semen bovino*. Retrieved from Boletín informativo del SERIDA - n.º 2: <http://www.serida.org/pdfs/1495.pdf>
- Hughes, C. M., Lewis, E. M., McKelvey-Martin, V. J., & Thompson, W. (1997). Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 374, 261–268.
- Hughes, C. M., Lewis, S. E., McKelvey-Martin, V. J., & Thompson, W. (1996). A comparison of baseline and induced DNA damage in human sperm from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod*, 2, 613–619.
- Hull, M. G., Glazener, C. M., Kelly, N. J., Conway, D. I., Foster, P. A., Hinton, R. A., . . . Desai, K. M. (1985). Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *BRITISH MEDICAL JOURNAL*, 291, 1693–1697.
- Hwang, E. S., & Bowen, P. E. (2007). DNADamage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement and Modulation by Diet and Environment. 1(47), 27–50.
- Irvine, D. S. (1998). Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod*(13), 33–44.
- Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., & Aitken, R. J. (2000). DNA Integrity in Human Spermatozoa: Relationship With Semen Quality. *Journal of Andrology*, 21(1).
- IRVINE, D. S., TWIGG, J. P., GORDON, E. L., FULTON, N., MILNE, P. A., & AITKEN, R. J. (2000). DNA Integrity in Human Spermatozoa: Relationship With Semen Quality. *Journal of Andrology*, 21(1).
- Jayaraman, V., Upadhyay, D., Kumar Narayan, P., & Kumar Adiga, S. (2012). Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet*, 29(6).
- Jensen, T. K., Bonde, J. P., & Joffe, M. (2006). The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occup Med*, 8(56), 544–553.

- Jung, A., & Schuppe, H. (2007). Influencia del estrés de calor genital sobre la calidad del semen en humanos. *Andrologia*, 39 (6): 203-15.
- Jurewicz, J., Hanke, W., Radwan, M., & Bonde, J. P. (2009). Environmental factors and semen quality. *Int J Occup Med Environ Health*(22), 305-329.
- Jurewicz, J., Radwan, M., Sobala, W., Radwan, P., Bochenek, M., & Hanke, W. (2014). Effects of occupational exposure - is there a link between exposure based on an occupational questionnaire and semen quality? *Syst Biol Reprod Med*, 60(4); 227-233.
- Kierszenbaum A, L. (2001). Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Molecular Reproduction and Development*. 58, 357-358.
- Kumar, K., Thilagavathi, J., Deka, D., & Dada, R. (2012). Unexplained early pregnancy loss: Role of paternal DNA. *Indian J Med Res*, 136(2): 296–298.
- Lepecka-Klusek, C., Wdowiak, A., Pilewska-Kozak, A., Syty, K., & Jakiel, G. (2011). The role of age, environmental and occupational factors on semen density. *Ann Agric Environ Med*, 18(2):437-40.
- Lewis, S. E. (2013). The place of sperm DNA fragmentation testing in current day fertility management . *Middle East Fertil Soc J*, 18:78-82.
- Liao, W., McNutt, M., & Zhu, W. (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48:46–53.
- Lichtman, M. A. (2007). Cigarette smoking, cytogenetic abnormalities, and acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, 21:1137–1140.
- Machado, A., Lima, P., Alves, R., & Rodríguez, R. (2009). Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay. *Reviews in Fisheries Science*, 17(2):170–173.
- Magnusdottir, E. V., Thorsteinsson, T., Thorsteinsdottir, S., Heimisdottir, M., & Olafsdottir, K. (2005). Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod*(20), 208– 215.
- Málaga C, Y. R., Ortiz N, D. A., Hernández M, I., Tovar J, M., & Ayalara. (2005). Detención de la espermatogénesis. *Ginecol Obstet Mex* 73:09.
- Marcon, L., & Boissonneault, G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodelling. *Biol. Reprod*, 70, 910–918.
- Meeker, J. D., Barr, D. B., & Hauser, R. (2008). Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Hum Reprod*, 1932-1940.

- MIEUSSET , R., & BUJAN, L. (1995). Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *International Journal of Andrology*, 18: 169-184.
- MIEUSSET , R., BENGOU DIFA, B., & BUJA, L. (2007). Effect of Posture and Clothing on Scrotal Temperature in Fertile Men. *Journal of Andrology*, 28:170–175.
- Migliore, L., Naccarati , A., Zanello, A., Scarpato, R., Bramanti, L., & Mariani, M. (2002). Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Hum Reprod*, 2912- 2918.
- Miller, D., Brinkworth, M., Iles D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*.139(2), 287-301.
- Miranda, L., Cruz, I., Osuna, J. A., Gómez, R., Berrueta, L., Siham, S., . . . Andrade, H. (2015). Efectos de la exposición ocupacional a plaguicidas sobre la calidad del semen en trabajadores de una comunidad agrícola del estado Mérida, Venezuela. *Invest Clin* 56(2).
- Morris, I. D., Llott , S., Dixon, L., & Brison, D. R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*(17), 990-998.
- Mortimer, S. T. (2005). Essentials of sperm biology. (P. E. Patton, & D. E. Battaglia, Eds.) *Humana press*(1), 1-9 1st ed.;
- Mudry, M., & Carballo, M. (2006). *Genética Toxicológica*. Buenos Aires: De los Cuatro Vientos Editorial. Primera Edición.
- Nallella, K. P. (2006). Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility*. Vol. 85, No.3., 629-634.
- Oliva , A., Spira , A., & Multigner, L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction* , 1768-1776.
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod*, 12, 417-435.
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M. C., Sharma , R. K., Agarwal , A., Larson, K., . . . Alvarez, J. G. (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod*, 16(9):1912-21.
- Ostling , O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 291–298.
- Pereira da Silva , V. H., de Luna, A. R., Pompeia, S., & Ribeiro, D. A. (2015). Cytogenetic Biomonitoring in Buccal Mucosa Cells from Young Smokers. *Acta Cytol*, 474-478.

- Portella, J., López, R., & Noriega-Hoces, L. (n.d.). Modelo predictivo de fragmentación de ADN espermático usando parámetros evaluados en un espermatograma.
- Quintero, G., Bermúdez, R., & Castillo, J. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: un problema actual. *Rev Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18:144-51.
- Ribas, M. J., García, P. A., Abad, C., & Amengual, M. J. (2012). Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod*(27), 652–658.
- Ritter, D., & Knebel, J. (2009). Genotoxicity testing in vitro – Development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicology in Vitro*, 23:1570–1575.
- Romero, E. (2012). *Determinación de gentoxicidad en neonatos mediante métodos de diagnóstico no invasivo*. Granada, España: Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Rubes, J., Rybar, R., & Prinosilova, P. (2010). Genetic polymorphisms influence the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation Research*, 683(1-2): 9–15.
- Rubes, J., Selevan, S. R., & Sram, R. J. (2007). GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation Research*, 625(1-2): 20–28.
- Sakkas, D., A. J. (2011). Fragmentación del ADN espermático: mecanismos de origen, repercusión en los resultados reproductivos y análisis. *Rev Mex Med Repro*, 4 (3), 160 – 175.
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*, 1;93(4):1027-36.
- Sánchez-Peña, L. C., & et al. (2004). Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 196, 108-113.
- Saucedo, E., López-Reyes, J., Moraga, M., Romeu, S., & Carmona, I. (2017). Fragmentación del ADN espermático: situación actual. *Ginecol. obstet. Méx*, 85(3): 164-189.
- Schmid, T. E., Eskenazi, B., Baumgartner, A., Marchetti, F., Young, S., Weldon, R., . . . Wyrobek, A. J. (2007). The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod*, 22:180-187.
- Schmidt, L., & Münster, K. (1995). Infertility, involuntary infecundity, and the seeking of medical advice in industrialized countries 1970–1992: a review of concepts, measurements and results. *Hum. Reprod.*, 6(10), 1407-1418.

- Schulte , R. T., Ohl, D. A., Sigman , M., & Smith , G. D. (2010). Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet*, 3-12.
- Sepaniak, S., Forges, T., Gerard, H., Bernard , F., Bene, M.-C., & Monnier-Barbarino, P. (2006). The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* , 54–60.
- Seshagiri , P. B. (2001). Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci*(26), 429-435.
- Shaman, J. A., & Ward, W. S. (2006). Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 31-48.
- Sharma, R., Agarwal, A., K Rohra, V., Assidi, M., Abu-Elmagd, A., & F Turki, R. (2015). Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol*, 35.
- Sharpe, R. M. (2010). Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 365, 1697–1712.
- Shine , R., Peek, R., & Birdsall, M. (2008). Declining sperm quality in New Zealand over 20 years. *N Z Med J*(121), 50-56.
- Sinawat, S. (2000). The environmental impact on male fertility. *J Med Assoc Thai*, 880–885.
- Singh , N. P., & Stephens, R. E. (1997). Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat Res*, 167–175.
- Singh , N. P., Muller , C. H., & Berger, R. E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 1420-1430.
- Singh, N. P., Danner , D. B., Tice , R. R., McCoy, M. T., Collins, G. D., & Schneider, E. L. (1989). Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res*, 461-470.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*, 175: 184-191.
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R., & Schneider, E. (1998). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175:184–191.
- Song, G. S., & Seo, J. T. (2006). Changes in the scrotal temperatura of subjects in a sedentary posture over a heated floor. *Int J Androl*(29), 446-457.
- Steele, K., McClure, N., Maxwell, R., & Lewis, S. (1999). A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Molecular Human Reproduction* , (5): 831-835.

- Stocks, S. J., Agius, R. M., Cooley, N., Harrison, K. L., Brison, D. R., Horne, G., . . . Povey, A. C. (2010). Alkylation of sperm DNA is associated with male factor infertility and a reduction in the proportion of oocytes fertilised during assisted reproduction. *Mutat Res*, 18-23.
- Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature*, 739-750.
- Tas, S., Lauwerys, R., & Lison, D. (1996). Occupational Hazards for Male Reproductive system. *Critical Reviews in Toxicology*, 26, 261-307.
- Tesarik, J., Greco, E., & Mendoza, C. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*, 19, 611-615.
- The European Network on the Health and Environmental Impact of Nano materials. (n.d.). *Comet Assay*.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., . . . Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*, 35, 206-221.
- Tice, R., & Vasquez, M. (1999). Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells.
- Twigg, J., Irvine, D. S., Houston, P., Fulton, N., Michael, L., & Aitken, R. J. (1998). Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod*, 4(5):439-45.
- Valdivia, M. V., Temoche, H., & Cruz, V. (2014). Efecto de los campos magneticos sobre la fertilidad masculina y en animales de laboratorio. *Spernova*, 4(1): 20-25.
- Valverde, M., & Rojas, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the comet assay. *Mutat Res*, 93-109.
- Van der Heijden, G. W., Ramos, L., Baart, E. B., van den Berg, I. M., Derijck, A. A., Van der Vlag, J., . . . de Boer, P. (2008). Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol*, 31;8:34.
- Vaziri, M. H., Sadighi Gilani, M. A., Kavousi, A., Firoozeh, M., Khani, J. R., Vosough Taqi, D. A., & Salman, Y. R. (2011). The Relationship between Occupation and Semen Quality. *International Journal of Fertility & Sterility*, 5(2), 66-71.
- Vergara, G. (2010). *Estandarización del cometa alcalino en células de sangre periférica*. Bogotá: Tesis de grado Pontificia universidad Javeriana Facultad de ciencia Biología.
- Wang, C. (2007). ¿Cómo contribuye el análisis del semen al conocimiento del estado reproductivo del hombre? In *Manual de Andrología* (2da ed.).

- Ward , W. S., & Coffey, D. S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, 44(4):569-74.
- Ward, W. S. (2011). Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. *Biol Reprod*, 84: 841-84.
- WHO. (2010). *World Health Organization. Laboratory Manual for the examination and processing of human semen* (Fifth Edition ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Wright, C., Milne, S., & Leeson, H. (2014). Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online*, 684 – 703.
- Yamamoto, N. (1969). Damage, repair, and recombination. Effect of hydrogen peroxide on the bacteriophage genome. *Virology*(38), 457–463.
- Younglai, E. V., Holloway, A. C., & Foster, W. G. (2005). Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. *Hum. Reprod*(11), 43-57.
- Yucra, S., Gasco, M., Rubio, J., & Gustavo , F. (2008). Exposición ocupacional a plomo y pesticidas organofosforados: efecto sobre la salud reproductiva masculina. *Rev. Perú. med. exp. salud publica*, v.25 n.4 .
- Zhang, T., Hu, J., Zhang, Y., Zhao, Q., & Ning, J. (2010). Leucocytes DNA damage in mice exposed to JS-118 by the comet assay. *Human & Experimental Toxicology*.
- Zúñiga, L. (2009). *Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana*. Universidad Autónoma de Barcelona: Tesis doctoral.

ANEXOS

Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

A Usted se le está solicitando participar en este estudio. Antes que decida participar usted necesita tener información para que decida su participación voluntaria en el mismo.

“Asociación entre el daño en ADN espermático y factores de riesgo ocupacional en pacientes con problemas de fertilidad atendidos en el Instituto Nacional Materno Perinatal, Lima, Perú”.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: Realizar el estudio en varones de diferentes ocupaciones y separar las ocupaciones con mayor exposición a diferentes factores de riesgo que puedan estar causando daño en el ADN espermático.

PROCEDIMIENTOS: De la muestra de semen entregada (Volumen aprox. 1.5-2ml), por el método de masturbación, en un frasco estéril, 3-7 días de abstinencia. Se requerirá 300 µl para determinar el daño en el ADN espermático mediante el ensayo Cometa.

POSIBLES BENEFICIOS: Usted podrá saber si presenta o no daño en el ADN espermático de manera **GRATUITA**, ya que estos estudios son costosos. De este modo obtendrá las recomendaciones médicas de especialistas en el caso de que quiera tener hijos, además de tener consideraciones en el lugar de trabajo.

POSIBLES MOLESTIAS: La única posible molestia que usted podría tener, es la hora de recepción (7:10-8:10 am) porque podría cruzarse con su hora laboral.

PRIVACIDAD: Cada participante accederá a sus resultados de **MODO PERSONAL** previa correcta identificación, sin que ninguna persona divulgue los resultados obtenidos del paciente. El estudio se realiza con fines científicos.

PARTICIPACION VOLUNTARIA: Para que pueda participar de este estudio es necesario que Usted nos de su consentimiento informado de manera **VOLUNTARIA** para poder realizar el procedimiento completo que incluye un **CUESTIONARIO**. Usted es quien decide su participación. Así mismo, Usted tiene la libertad de retirarse del estudio cuando más lo crea conveniente.

INVESTIGADORES RESPONSABLES: Si tiene alguna pregunta sobre el presente estudio, puede comunicarse con coordinador del Laboratorio Clínico de CENSOPAS/Instituto Nacional de Salud: Jaime Rosales Rimache teléfono 7480000 Anexos 7725, también puede ponerse en contacto con el investigador para mayor información de los procedimientos y técnicas empleadas en este estudio, a través del Instituto Nacional de Salud – Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Ambiente para la Salud:

Laboratorio Clínico del CENSOPAS: 7480000 Anexos 7725 (Horario 1 p.m – 3 p.m)

Investigador principal: Antuane Zevallos M. (992671188)

Si usted voluntariamente está de acuerdo en participar en este estudio es necesario su firma en este documento, en presencia de un testigo.

NOMBRE: _____

DNI: _____

TELÉFONO: _____

E-MAIL: _____

FIRMA

HUELLA DIGITAL



Hora cita: _____

Paciente Nº _____

ANEXO 2. CUESTIONARIOS

PRE-CUESTIONARIO

TODA LA INFORMACION ES Estrictamente CONFIDENCIAL

Edad: _____ (años) Sexo: M ¿Tiene hijos? _____ ¿Cuántos? _____ edades: _____

¿Hace cuánto tiempo intentan tener hijos? _____

Edad de la esposa: _____ (años) ¿Primera vez del estudio?: _____ ¿Cuántas? _____

¿Días de abstinencia sexual? _____

Por favor lea las preguntas cuidadosamente. Responder a este cuestionario con la verdad.

1.- ¿Fuma? **Sí / No**

Si fuese sí, en las últimas 24 horas ¿Cuántos cigarrillos? _____ ¿Cuán frecuente? _____
(OCASIONALMENTE, más de 3 cigarrillos/día).

En las últimas 24 horas ¿Ha estado expuesto por otros fumadores? **Sí / No**
¿cuánto tiempo ha estado expuesto? _____

2.- ¿Consume bebidas alcohólicas? **Sí / No**

Si fuese sí, ¿Qué tipo? _____ ¿Cuán frecuente? _____
(OCASIONALMENTE/ A diario) _____ (3 vasos / más 3 vasos al día).

3.- ¿Consume o ha consumido alguna droga? **Sí / No**

Si fuese sí, ¿Qué tipo? _____ ¿Cuándo o Cuán frecuente? _____
(uso ocasional, frecuente, muy frecuente).

4.- ¿Come una dieta especial? **Sí / No**

Si fuese sí, descríbala: _____ (Vegetariano, vegano, por algún tratamiento)

5.- ¿Ha estado enfermo hace poco? **Sí / No**

Si fuese sí, ¿Cuándo? _____ Y ¿De qué? _____

¿Fiebre alta (38.5C) en los últimos 3 meses? **Sí / No**

¿Está tomando algún MEDICAMENTO? **Sí / No**

Si fuese sí, ¿Cuál? _____

6.- ¿Consume suplementos vitamínicos? **Sí / No**

Si fuese sí, ¿Cuál y la razón? _____

7.- ¿Ha tomado baños calientes, sauna, últimamente? **Sí / No**

Si fuera sí, hace cuánto tiempo: _____ Menos de una semana / Más de una semana.

8.- ¿en su familia, presenta alguna enfermedad hereditaria? **Sí / No**

Si fuese si, descríballo: _____

Diabetes: **Sí / No** Cáncer: **Sí / No** Familiares: **Sí / No** Órgano afectado: _____

9.- ¿Paperas? **Sí / No** ¿Edad? _____

10.- ¿Vasectomía? **Sí / No**

11.- ¿Patología genital? **Sí / No**

Si fuera si, ¿De qué tipo? _____

(Criptorquidia, trauma escrotal, varicocele, cirugía para hernia inguinal, infecciones del tracto urogenital: Gonorrea **Sí / No** Sífilis **Sí / No** VIH-SIDA **Sí / No**). Tiempo: _____

12.- ¿Se considera una persona saludable? **Sí / No**

Golpes fuertes en los testículos: **Sí / No**

FUENTE: Altakroni, 2014

CUESTIONARIO

TODA LA INFORMACION ES Estrictamente CONFIDENCIAL

Ejemplo de llenado: **Grado de Estudios:** Técnico en computadoras **Puesto de trabajo actual:** Call center **¿Cuántas hora al día?** 9 horas **¿Hace cuánto tiempo (meses, años)?** 4 meses **¿Qué actividades realiza?** Contestar el teléfono y orientar a los clientes, mucho tiempo sentado **¿Utiliza algún equipo de protección personal?** Ninguno.

1.- Grado de estudios:

_____ Puesto de trabajo actual:
_____ ¿Cuántas horas al día? _____ ¿Hace cuánto tiempo? _____ ¿Qué actividades realiza?

_____ ¿Utiliza algún equipo de protección personal? _____

2.-Ocupaciones anteriores:

_____ Tiempo: _____

3.- ¿Está expuesto o ha estado expuesto a algún riesgo en su trabajo?

Sí / No

Si fuese sí, ¿Cuál? especifique _____

Ejemplos de agentes químicos en el trabajo: Metales pesados **Sí / No**, pesticidas **Sí / No**, disolventes inorgánicos: **Sí / No**, humo **Sí / No**, hidrocarburos **Sí / No**.

Ejemplos de agentes físicos ocupacionales: Radiaciones **Sí / No**, Campos Electromagnéticos **Sí / No**, vibraciones mecánicas **Sí / No**, el exceso de calor **Sí / No**, largos periodos de estar sentado **Sí / No**.

FUENTE: Altakroni, 2014

Sí específico, marque verdadero o falso según el enunciado sobre los riesgos en su trabajo:

RIESGOS QUÍMICOS Sí / No	Verdadero	Falso	No aplicable/Comentario
Se usan sustancias químicas peligrosas.			
Se han identificado los riesgos relacionados con dichas sustancias.			
Evalúan periódicamente los niveles de concentración de dichas sustancias en el ambiente.			
El ambiente está completamente libre de riesgo para la salud del trabajador a través de la <u>inhalación, contacto o ingesta de las sustancias químicas.</u>			
Se informa a los trabajadores sobre los riesgos que representa el uso de las sustancias químicas			
Se suministran equipos y vestimenta de protección personal.			
El equipo y la vestimenta de protección personal son adecuados.			
RUIDO Y VIBRACIONES Sí / No	Verdadero	Falso	No aplicable/Comentario
Se utilizan máquinas y herramientas que generan ruido y vibraciones.			
Se presentan casos de <u>irritabilidad, dolor de cabeza, insomnio, otros</u> a causa del ruido y las vibraciones existentes en la empresa.			
Se utilizan técnicas de control de las vibraciones en los pisos.			
Se emplean aditamentos especiales para el control de la exposición a las vibraciones y ruido. (Tampones, otros.)			
AMBIENTES TERMICOS Sí / No	Verdadero	Falso	No aplicable/Comentario

Hay fuentes radiantes exteriores de calor.			
Hay fuentes radiantes interiores de calor. (Equipos)			
Se cuenta con medios de control del calor (extracción localizada, aislamiento, etc.)			
Se evalúa periódicamente la exposición de los ambientes térmicos.			
Se utilizan equipos y vestimentas de protección contra el calor.			
Se regulan los tiempos de exposición y de descanso en los ambientes térmicos.			
RADIACIONES Sí / No	Verdadero	Falso	No aplicable/Comentario
Los trabajadores se exponen a <u>radiaciones ionizantes, infrarrojas, ultravioletas, microondas, radiofrecuencias, Otros.</u>			
Se evalúa periódicamente la exposición a radiaciones.			
Se utilizan métodos adecuados de control de las radiaciones.			
Los trabajadores utilizan equipos y prendas de protección personal.			
Los trabajadores tienen conocimiento de los riesgos que suponen la exposición a las radiaciones.			

FUENTE: Programa de accidentes de trabajo EPINET 2002 - Organización Panamericana de la Salud.

ANEXO 3.

Tabla 20. Resumen de Buffers y soluciones usadas para el ensayo Cometa alcalino.

Buffer/Solución	Componentes
Agarosa regular	0.5% (p / v) (Sigma) en 1X Solución salina fosfato (PBS) sin Mg ++ y Ca ++ preparada.
Agarosa de bajo punto de fusión	0.7% (p / v) en 1X PBS sin Mg ++ y Ca ++.
Buffer de lisis	NaCl 2,5 M (Sigma), Na ₂ EDTA 100 mM, 10 mM Tris-base, dimetil sulfóxido al 10% (DMSO) y 1% Triton X-100, pH 10. La solución de lisis stock se mantuvo a una temperatura de 4° C, el DMSO y Triton X-100 solo se agregan minutos antes de su uso. Proteinasa K (Sin ADNsa) y DTT se prepararon por separado y al instante después del primer buffer de lisis.
Buffer de Electroforesis	1 L de este tampón se prepara el día de experimento mezclando 5 ml de 0.2 M de Na ₂ EDTA (pH 10) con 965 ml de agua ultrapura y luego agregar 30 ml de NaOH 10M (pH ≥ 13). Guardado a temperatura de 4° C antes de su uso. V=Voltaje mA=Miliamperios
Buffer de Neutralización	Tris-base 0,4 M en agua ultrapura, pH 7,0-7,5. Guardado a temperatura de 4° C.
Tinción	1/10000 (v / v) SYBR gold (Invitrogen, UK, C.N:S11494) en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5. Guardado a temperatura de 4° C.

Tabla 21. El efecto de la concentración de Proteinasa K en el buffer de lisis, muestra tratada con Peróxido de Hidrógeno verificación de resultados según Altakroni 2014* y comparación con el presente estudio (Sin resultados).

Condición	Intensidad de ADN en la cola (Media)	
	Ejemplo 1	Ejemplo 2
Proteinasa K 100 µg/ml (Solo)	Sin resultados	
DTT (Solo)	Sin resultados	
Proteinasa K 100 µg/ml + DTT	68.5*	56.1*
Proteinasa K 50 µg/ml + DTT	54.8*	46.6*

Tabla 22. Daño genotóxico (ensayo Cometa) en pacientes expuestos y no expuesto.

	EXPUESTOS	NO EXPUESTOS	p-valor
Longitud de la cola	40.93822	32.17274	0.0167*
DS	16.22673	13.02357	
Mediana	44.10256	28.71795	
Rango	77.82051	46.66667	
Min	7.179487	11.79487	
Max	85	58.46154	
Porcentaje de Intensidad	28.68253	17.30042	0.0334*
DS	20.81547	16.77927	
Mediana	30.48998	12.99957	
Rango	74.42648	50.99962	
Min	.0025834	.123859	
Max	74.42906	51.12348	
Momento de la cola	5.727435	3.158247	

DS	4.653408	3.483241	0.0167*
Mediana	5.464008	1.826461	
Rango	19.44713	11.56582	
Min	.0002385	.0007705	
Max	19.44737	11.56659	

DE: Desviación estándar, Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo, ***p-valor** estadísticamente significativo.



Figura 35. Microscopio de fluorescencia equipado con un filtro azul ($\lambda = 500 \text{ nm}$), Mca Meiji Techno MT600.

GLOSARIO

- Capacitación espermática: Fase final del desarrollo del espermatozoide en la que adquiere capacidad para fecundar al ovocito, en la cual experimenta una serie de cambios en su movilidad. En el laboratorio es llamado recuperación de espermatozoides móviles y ocurre después de un *swim up* o gradiente de densidades.
- Criopreservación: Proceso para enfriar y almacenar células a bajas temperaturas para su uso en el futuro.
- Electroforesis: Procedimiento que consiste en la inducción de un campo eléctrico con el fin de separar moléculas en base a su carga eléctrica y masa.
- Embrión: Producto de la división del cigoto hasta el fin del estadio embrionario (8 semanas después de la fecundación).
- Fértil: Persona o animal con capacidad de reproducirse.
- Fertilización: Proceso en el cual el espermatozoide penetra en el ovocito maduro, permitiendo que la carga genética materna y paterna se unan para formar el embrión.
- Idiopática: Término que se emplea en medicina cuando no se encuentra una causa que justifique una afección (ej.: infertilidad idiopática).
- Implantación: Proceso de unión y subsecuente penetración del blastocisto libre de zona pelúcida usualmente en el endometrio, que comienza 6 a 7 días después de la fecundación.
- Longitud de la cola: *Tail length*, distancia de migración de ADN del origen en μm .
- Movilidad: Facultad de moverse que tiene la materia viva como respuesta a ciertos estímulos.
- Neutralización: Es la disminución o anulación del efecto de cierta acción (solución) porque aparece otra contraria que la contrarresta.
- Nucleoide: Estructura nuclear desproteinizada por el ensayo Cometa.
- Ovocito: Gameto femenino, están contenidos en los folículos y son expulsados cuando estos se rompen en folículos.
- Porcentaje de intensidad: *Tail intensity*, mide la migración del ADN, se basa en la intensidad de la luz emitida por la cola del "cometa".
- P-valor: Se define como la probabilidad de obtener, por azar, una diferencia tan grande o mayor de la observada (hipótesis nula).
- Momento de la cola: *Tail moment*, es el producto del porcentaje del ADN en el cometa (intensidad) y la media de la distancia entre la cabeza y la cola.
- Vitalidad: Se refiere al porcentaje de espermatozoides vivos, debe ser superior a 58%. Para analizarlo se realiza una tinción y se identifica a los espermatozoides con la membrana intacta que evita que ingrese el colorante.